

UNIVERSIDAD AUTÓNOMA DE MADRID

Facultad de Medicina

Departamento de Medicina



**POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SISTEMA RENINA-
ANGIOTENSINA Y DEL GEN DE LA ÓXIDO NÍTRICO
SINTASA EN LA REGULACIÓN DE LA PRESIÓN ARTERIAL
EN UNA POBLACIÓN ESPAÑOLA**

TESIS DOCTORAL

MARÍA ESPERANZA MARTÍNEZ NAVARRO

Madrid, 2002

R.F.M. 22094

DIRECTORES:

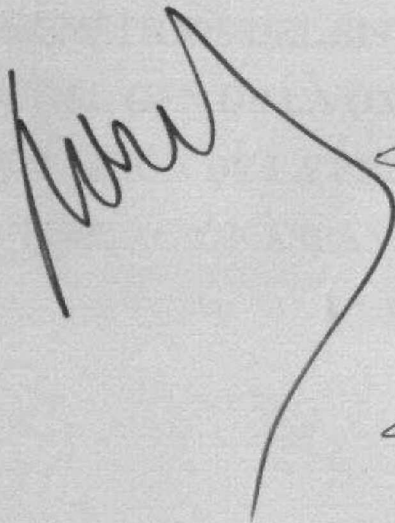
Dr. D. Ángel Puras Tellaèche

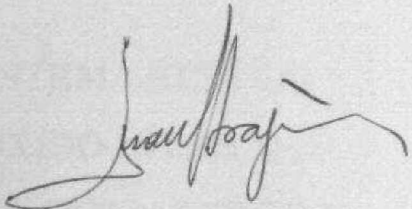
Prof. Dr. D. Julio Escribano Martínez

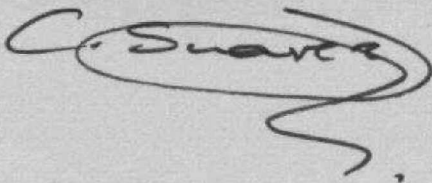
Prof. Dr. D. Manuel de Oya Otero

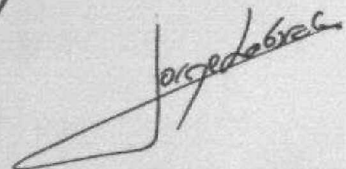
Reunido el Tribunal que suscribe en el día de la
fecha, acordó calificar la presente Tesis Doctoral
con la censura de Deseraliens cum laude per unanimem
Madrid, 22 Abril 2002











El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

Este trabajo ha sido financiado por el proyecto del Fondo de Investigación Sanitaria FIS 97/2123, por una Beca de Formación de Personal Investigador de Cultural Albacete y por una Beca de Investigación del Complejo Hospitalario de Albacete en colaboración con Caja Castilla-La Mancha.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

El Instituto de Caja (Caja) Castellano de Farmacia Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

D. Manuel de Oya Otero, Catedrático de Patología Médica de la Facultad de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid.

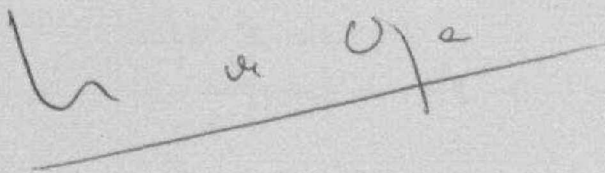
D. Julio Escribano Martínez, Profesor Titular de Genética de la Facultad de Medicina de la Universidad de Castilla-La Mancha.

CERTIFICAN:

Que Dña. M^a Esperanza Martínez Navarro, Licenciada en Ciencias Biológicas, ha realizado bajo nuestra dirección el trabajo titulado: **Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina y del gen de la óxido nítrico sintasa en la regulación de la presión arterial en una población española**, para optar al Grado de Doctor.

Dicho trabajo reúne, a nuestro juicio, las condiciones de originalidad y rigor metodológico necesarios para ser sometido a lectura y discusión ante el Tribunal correspondiente.

Para que conste y a los efectos oportunos, firmamos la presente en Madrid a 20 de Diciembre de 2001.



Prof. D. Manuel de Oya Otero



Prof. D. Julio Escribano Martínez

Esta Tesis está dedicada a dos personas que han fallecido en el transcurso de su elaboración y que se hubieran sentido muy felices de haber podido verla acabada.

A MI PADRE

*Siempre consideré que lo más importante
que podía transmitir a sus hijos era una educación
y su amor por el conocimiento*

A ÁNGEL

*Nos contagió a todos los que estuvimos
ceranos a él su gran capacidad de trabajo y afán por
avanzar en los caminos de la Ciencia*

Agradecimientos:

Al Dr. Ángel Puras por integrarme en su equipo de investigación, ahora también el mío (GEVA), abrirme el camino de la epidemiología genética y transmitirme ilusión. Su recuerdo me acompaña como ejemplo científico y humano.

Al Profesor Julio Escribano, por enseñarme como "cazar" genes y por la dirección de la Tesis con dedicación y exhaustiva búsqueda de la perfección.

Al Profesor Manuel de Oya, por aceptar la dirección de este Proyecto, por sus consejos y sus magníficos cursos de Doctorado, elaborados junto con la Dra. Garcés, a los que tuve la fortuna de asistir, y de los cuales era difícil salir sin un gran entusiasmo por la investigación. A ambos quiero agradecer su afecto y ayuda.

A mis compañeros del Grupo de Enfermedades Vasculares de Albacete (GEVA) Miguel Artigao, Julio Carbayo, Lucinio Carrión, Juan Antonio Divisón, Francisco García, Juan López-Abril, Enrique López de Coca, Javier Massó, Beatriz Rodríguez, Carlos Sanchis y Amelia Vidal, cuyo trabajo de campo es la base de esta Tesis. Colaboré con ellos en la última fase del mismo y sé lo que hay detrás de cada muestra que manejé en el laboratorio.

A los doctores Carlos Sanchis y Julio Carbayo quiero agradecerles su inestimable ayuda con los "números", sin ellos no habría sabido como manejar tantos datos. Además de sus pacientes lecciones de estadística.

Al Dr. Lucinio Carrión, por sus enseñanzas en la clínica de la hipertensión.

Al Dr. Francisco Sánchez por su ayuda y disposición, tanto en la puesta a punto de técnicas de biología molecular como en el manejo informático de la Memoria.

Al Profesor Damián García-Olmo, entonces coordinador de la Unidad de Investigación del Hospital General de Albacete, por su apoyo en momentos difíciles, por dirigir la Unidad con entusiasmo y eficacia y además darme la oportunidad de trabajar durante un tiempo en su línea de investigación en biología molecular del cáncer, una de las más brillantes que ha tenido el Hospital.

A Elena Navarro, Jesús Ontañón y María García, amigos y compañeros, quiero agradecerles su ayuda y tan buenos y largos ratos pasados en el Laboratorio de Biología Molecular, esperando electroforesis, digestiones, PCRs y demás.

A Trinidad Flores, por su entrañable amabilidad y eficacia.

A los compañeros de la Unidad de Investigación, Dolores García-Olmo, Rafael Casado, Vicente Pla, Ester Pérez, Mamen López, Susana y Aurelio, que en más de una ocasión me " echaron una mano " para completar este trabajo.

A Francisco Palacios y José Manuel Muñoz, de la biblioteca del Hospital, por su ayuda para conseguir los muchos y a veces difíciles artículos que solicité.

A los doctores Josep Redón, Javier Chaves y Pablo Marín, con quienes hemos iniciado una fructífera colaboración, que ya está dando resultados.

A las personas que han constituido la población estudiada, por su ayuda anónima y colaboración en un proyecto de investigación que, en algunos casos, pudieron no entender pero confiaron en quienes lo elaboramos. Sin ellos no podría avanzar el conocimiento científico.

A mis amigas, Ascensión, Isabel, M^a Ángeles, M^a Dolores, Marisa, Mercedes, Rosalina, Victoria y Yolanda. Por sus incansables palabras de aliento y ánimo. Sin su amistad el camino sería mucho más difícil.

A mis hermanos y a Amparo, por su compañía y cariño.

A mi madre, por su dedicación incondicional y su amor sin medida.

A mi padre, un hombre excepcional, por su inteligencia, generosidad y entrega a su familia. Sé que mi doctorado le hubiera llenado de orgullo.

A José Antonio,

Su ayuda en el transcurso esta Tesis ha sido imprescindible. No sólo en el aspecto científico en el que su colaboración fue fundamental. El que yo fuese capaz de completar este proyecto, se lo debo a él. Me inspiró e instó a perseverar en el mismo y casi ha conseguido curar mis peores hábitos lingüísticos, aunque desafortunadamente aún restan muchas imperfecciones. Su profundo conocimiento de la Biología y de la Genética me han guiado desde que empecé mis estudios en la Facultad. Su talento y coraje han supuesto que siguiera adelante cuando quería abandonar. Su presencia y cercanía son cada día una razón para vivir.

*"Pensar, analizar, inventar (me escribió también) no son
actos anómalos, son la normal respiración de la inteligencia"*

J.L. Borges (Ficciones)

ÍNDICE

1. INTRODUCCIÓN.....	1
1.1. EPIDEMIOLOGÍA GENÉTICA.....	1
1.2. LAS ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES.....	3
1.3. CONCEPTO DE PRESIÓN ARTERIAL (PA).....	5
1.4. HIPERTENSIÓN ARTERIAL (HTA).....	7
1.5. CARÁCTER CUANTITATIVO DE LA PA.....	9
1.6. FACTORES REGULADORES DE LA PA.....	10
1.6.1. Factores ambientales.....	10
1.6.1.1. Estrés.....	12
1.6.1.2. Factores relacionados con la dieta.....	12
1.7. BASES GENÉTICAS DE LA PA.....	15
1.7.1. Historia.....	15
1.7.2. Polimorfismos genéticos.....	16
1.7.3. Formas mendelianas de hipertensión arterial.....	16
1.7.3.1. Aldosteronismo remediable por glucocorticoides.....	18
1.7.3.2. Síndrome del exceso aparente de mineralcorticoides.....	19
1.7.3.3. Hipertensión exacerbada en la gestación.....	20
1.7.3.4. El síndrome de Cushing.....	20
1.7.3.5. El síndrome de Liddle.....	21
1.7.4. Formas mendelianas de hipotensión.....	22
1.7.4.1. Pseudoaldosteronismo tipo 1.....	22
1.7.4.2. Síndrome de Gitelman.....	22
1.7.5. Hipertensión esencial.....	23

1.8. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA.....	25
1.8.1. Angiotensinógeno (AGT).....	26
1.8.1.1. Características de la proteína.....	26
1.8.1.2. Estructura del gen.....	28
1.8.1.3. Papel del AGT en el control de la presión arterial.....	29
1.8.1.4. Estudios de asociación.....	33
1.8.2. Renina.....	33
1.8.2.1. Características de la proteína.....	33
1.8.2.2. Estructura del gen.....	34
1.8.2.3. Estudios de asociación.....	35
1.8.3. Enzima convertidora de la angiotensina (ECA).....	37
1.8.3.1. Características de la proteína.....	37
1.8.3.2. Estructura del gen.....	40
1.8.3.3. Estudios de asociación.....	41
1.8.4. Receptores de la angiotensina II. tipo 1.y tipo 2.....	42
1.8.4.1. Características de las proteínas.....	42
1.8.4.2. Receptor AT1.....	43
1.8.4.3. Receptor AT2.....	45
1.8.4.4. Estructura del gen del receptor AT1.....	45
1.8.4.5. Estudios de asociación.....	46
1.8.5. Aldosterona.....	48
1.9. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA (ONS).....	49
1.9.1. Mecanismo de la óxido nítrico sintasa.....	49
1.9.2. Gen de la óxido nítrico sintasa.....	51

2. JUSTIFICACIÓN	53
3. OBJETIVOS.....	55
4. MATERIAL Y MÉTODOS.....	57
4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO.....	57
4.2. GRUPO ESPECIAL DE HIPERTENSOS SEVEROS.....	60
4.3. TRABAJO DE CAMPO.....	61
4.4. FASES DEL ESTUDIO.....	61
4.4.1. Citaciones.....	61
4.4.2. Etiquetado.....	61
4.4.3. Consentimiento informado.....	62
4.4.4. Confidencialidad.....	62
4.4.5. Medición de las variables clínicas.....	62
4.4.5.1. Medición de la PA.....	62
4.4.5.2. Medidas antropométricas.....	63
4.4.6. Recogida de muestras biológicas.....	63
4.5. BIOQUÍMICA GENERAL.....	64
4.6. DETERMINACIÓN DE LA ECA.....	64
4.7. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO (ON) EN SUERO.....	65
4.8. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS.....	66
4.8.1. Extracción de ADN genómico humano.....	66
4.8.2. Cuantificación del ADN obtenido.....	66
4.8.3. Análisis de los polimorfismos del gen del AGT.....	67
4.8.4. Análisis del polimorfismo <i>I/D</i> del gen de la ECA.....	69
4.8.5. Análisis de los polimorfismos del gen del receptor AT1.....	71
4.8.6. Análisis del polimorfismos <i>BglII</i> del gen de la renina.....	75
4.8.7. Análisis de los polimorfismos del gen de la ONS.....	76

4.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.....	81
5. RESULTADOS.....	83
5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA.....	83
5.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR.....	88
5.3. AGREGACIÓN FAMILIAR DE LA HTA.....	90
5.4. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR.....	91
5.5. POLIMORFISMOS DEL GEN DEL AGT.....	93
5.5.1. Polimorfismo <i>T174M</i>	94
5.5.2. Polimorfismo <i>M235T</i>	96
5.5.3. Estudio conjunto de ambos polimorfismos.....	98
5.5.4. Predicción de estructura secundaria del AGT.....	102
5.6. POLIMORFISMO <i>I/D</i> DEL GEN DE LA ECA.....	103
5.7. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO <i>I/D</i> DEL GEN DE LA ECA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.....	107
5.8. POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR AT1.....	109
5.8.1. Polimorfismo <i>A166C</i> del receptor AT1.....	110
5.8.2. Polimorfismo <i>C573T</i> del receptor AT1.....	111
5.9. ESTUDIO CONJUNTO DE DOS GENES DEL SRA.....	114
5.10. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA RENINA Y DEL GEN DE LA ONS CON HTA.....	115
5.10.1. Polimorfismo <i>BglII</i> del gen de la renina.....	116
5.10.2. Polimorfismos del gen de la ONS.....	117
5.10.2.1. Polimorfismo VTNR.....	117
5.10.2.2. Polimorfismo Glu298Asp.....	118
5.10.2.3. Polimorfismo -786.T→C.....	119
5.10.3. Medida de óxido nítrico en suero.....	120

6. DISCUSIÓN.....	121
6.1. ESTUDIO POBLACIONAL.....	121
6.2. AGREGACIÓN FAMILIAR.....	123
6.3. ANGIOTENSINÓGENO Y PRESIÓN ARTERIAL.....	124
6.4. ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA Y PRESIÓN ARTERIAL.....	135
6.5. RECEPTOR AT1 Y PRESIÓN ARTERIAL.....	144
6.6. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SRA.....	149
6.7. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN DE LA RENINA Y DEL GEN DE LA ONS CON HTA	150
6.7.1. Gen de la renina.....	150
6.7.2. Gen de la ONS.....	152
6.7.3. Niveles de ON en suero.....	156
6.8. PERSPECTIVAS.....	157
7. CONCLUSIONES.....	165
8. BIBLIOGRAFÍA.....	167
9. ABREVIATURAS.....	189
10. ANEXOS	191
10.1. ANEXO 1: Primera carta de citación a los participantes.....	191
10.2. ANEXO 2: Segunda carta de citación a los participantes.....	192
10.3. ANEXO 3: Cuestionario.....	193
10.4. ANEXO 4: Informe de resultados.....	216
10.5. ANEXO 5: Publicaciones.....	217

1. INTRODUCCIÓN

1.1. EPIDEMIOLOGIA GENETICA

A finales de los años 70 Morton y Chung describieron este nuevo campo de investigación y acuñaron el término "epidemiología genética". En los años 80, la epidemiología genética se estableció como una entidad aparte de la epidemiología y de la genética, a pesar de críticas tales como que representaba un desembarco de genetistas en el área, suponía una ausencia de apreciación de la importancia de los principios epidemiológicos e implicaba el uso indiscriminado de modelos estadísticos sin tener en cuenta la subyacente naturaleza biológica de la enfermedad.

Hay numerosas definiciones para la epidemiología genética. Morton (1992) la definió como "el estudio de la etiología de la enfermedad entre grupos de parientes, con el fin de aclarar las causas de la semejanza familiar y el estudio de las causas heredadas de la enfermedad en las poblaciones".

Tal vez haya una definición mejor para su comprensión y que da sentido al estudio objeto de esta tesis: "epidemiología genética es el estudio del papel de los factores genéticos y su interacción con los factores ambientales en la ocurrencia de la enfermedad en poblaciones humanas".

La mayoría de las enfermedades no tienen una etiología puramente genética o ambiental, sino que dependen de una interacción entre ambos factores. Incluso en enfermedades cuya etiología son procesos infecciosos o dependen claramente de factores ambientales, la susceptibilidad genética individual puede influir en determinar la última manifestación clínica.

Conseguir comprender el papel de los factores genéticos en la etiología de la enfermedad en poblaciones humanas, con el objetivo final de controlar y prevenir las enfermedades, es el propósito de esta disciplina (Figura 1).

Figura 1. Interacción entre los factores genéticos y ambientales en las enfermedades complejas.



1. Genética de poblaciones tradicional.
2. Epidemiología tradicional.

1.2. LAS ENFERMEDADES MULTIFACTORIALES

Muchas de las enfermedades más prevalentes son debidas a factores múltiples de tipo genético y ambiental, por lo que son difíciles de estudiar. En estas enfermedades multifactoriales o complejas se hallan implicados combinaciones de varios genes y de distintos factores medioambientales. Después de determinar la contribución del componente genético en cualquiera de estas enfermedades se busca establecer cuantos genes contribuyen a la misma. Los fenotipos intermedios son manifestaciones de tipo molecular, celular, tisular u orgánico a través de los cuales un gen puede influir en un estado final (fenotipo) fisiológico o fisiopatológico. En las enfermedades multifactoriales o complejas muchos genes actúan de forma aditiva a través de numerosos fenotipos intermedios para incrementar el riesgo de enfermedad. Pero los mismos genes también pueden influenciar otras enfermedades. Los factores ambientales pueden afectar al riesgo de la enfermedad de forma independiente, y también actuar a través de los fenotipos intermedios. Ejemplos de fenotipos intermedios en el caso de la hipertensión arterial son las concentraciones plasmáticas de lípidos en sangre, de renina plasmática y el cotransporte aumentado de sodio/litio, etc.

En cualquier gen que confiera susceptibilidad a una enfermedad hay generalmente múltiples alelos que afectan al riesgo en diferentes grados, fenómeno conocido como heterogeneidad alélica. Tenemos un buen ejemplo en el gen de la fibrosis quística (FQ) que tiene alrededor de 800 mutaciones asociadas con la enfermedad y después de una década de investigaciones, se ha evidenciado que el genotipo no siempre predice el fenotipo. Esto supone nueva complejidad al diagnóstico de la enfermedad, aunque permite la identificación de portadores del gen de la FQ. Tal multiplicidad de mutaciones y alelos asociados a la enfermedad es más la regla que la excepción (Terwilliger y Weis, 1998). Además algunas mutaciones en el gen de la FQ están asociadas a otros fenotipos como infertilidad masculina y aspergilosis broncopulmonar alérgica.

En otras enfermedades están involucrados múltiples genes. La migraña ha mostrado tener un componente genético en estudios familiares y de gemelos, aunque la identificación de los genes implicados en ella hasta el momento sólo ha

sido posible en un raro subtipo denominado migraña familiar hemipléjica. Los genes de canales de calcio en los cromosomas 1 y 19 tienen que ver con muchos pero no con todos los casos de migraña familiar hemipléjica. Para complicar más las cosas, incluso no todos los miembros de la familia con una mutación han manifestado migraña, y estas mutaciones no se han asociado convincentemente con formas comunes de migraña (Kaprio, 2000).

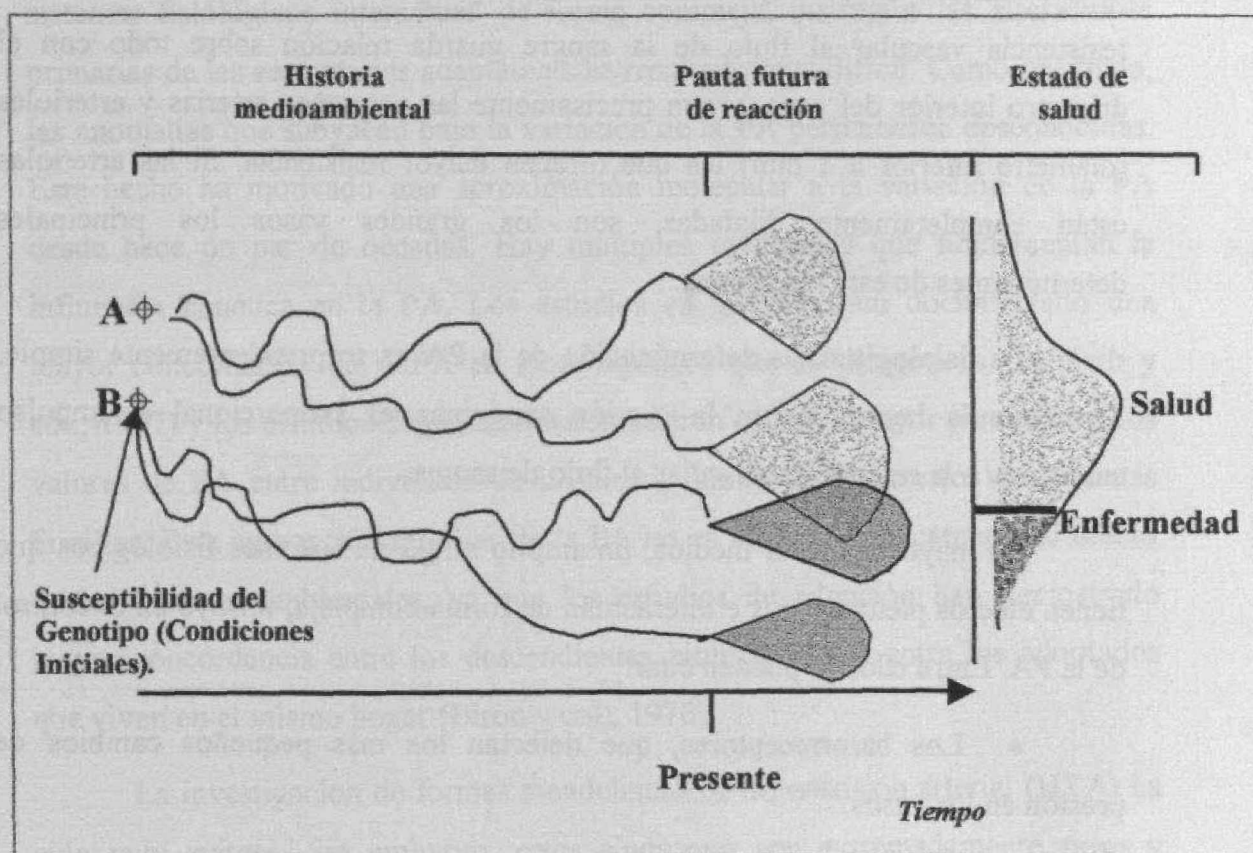
Los estudios realizados con enfermedades como la hipertensión arterial, el cáncer de mama y el cáncer colorrectal sugieren que los genes conocidos constituyen sólo una fracción del componente genético estimado. Esto podría deberse a que haya genes que jueguen un papel importante en la enfermedad y que aún no han sido identificados, aunque es más probable que la susceptibilidad genética se deba a múltiples genes de pequeño efecto, junto a interacciones gen-gen y gen-ambiente, de naturaleza compleja. Estos componentes son difíciles de estimar, al menos en seres humanos, con los diseños experimentales actuales. Además muchos factores de riesgo de la enfermedad como el tabaquismo, alcohol, obesidad y la inactividad física, se agregan en familias, siendo los factores genéticos parcialmente responsables de esta agregación familiar.

Las interacciones complejas son importantes a la hora de explicar las diferencias en la prevalencia de enfermedades entre poblaciones. Por ejemplo, los estudios poblacionales en gemelos en los países nórdicos en los años 90 sugieren que la heredabilidad del asma es de un 70% (Koppelman y col., 1999), sin embargo estudios con gemelos realizados en los años 70 sugerían que la heredabilidad era inferior al 50%, al tiempo que durante este periodo el asma ha incrementado su prevalencia. Ya que la susceptibilidad de los genes para el asma no puede haber cambiado en una generación, su expresión e interacción con factores ambientales puede haber cambiado y podría revertirse si fueran identificados y eliminados los factores ambientales apropiados.

Parece inevitable que el uso de la información genética llegará a ser rutinario en muchos campos de la medicina, posiblemente a través de perfiles genéticos en microchips de genes. Por otro lado, debido a que tanto los genes como el medioambiente están implicados en las enfermedades complejas, las causas ambientales y las interacciones gen-ambiente deberán continuar siendo cuidadosamente determinadas.

En las enfermedades complejas la susceptibilidad personal del genotipo y la historia ambiental se combinan para establecer el estado actual de salud, y la pauta de reacción del genotipo determina la trayectoria futura de salud (Figura 2).

Figura 2. Enfermedades complejas y relaciones genotipo-ambiente.



1.3. CONCEPTO DE PRESIÓN ARTERIAL

La presión arterial (PA) es una función fisiológica dinámica que varía con cada latido del corazón (O'Rourke, 1990; James y Baker, 1995). La PA es el producto del impulso cardíaco y la resistencia vascular al flujo sanguíneo (Lifton, 1996). Numerosos mecanismos fisiológicos, proteínas polimórficas y hormonas vasorreactivas, influyen en el sistema circulatorio para el mantenimiento de la

presión sanguínea y la oxigenación de tejidos y células. Los cambios en la PA de un instante al siguiente dependen de cómo estos factores interactúen en ese momento específico. Las dos fuerzas fisiológicas que determinan la tensión arterial son el gasto cardiaco y la resistencia vascular al flujo de sangre (resistencias periféricas). La cantidad de sangre que impulsa el corazón (gasto cardiaco) depende del volumen sistólico del ventrículo izquierdo y de la frecuencia cardiaca. Por tanto, sobre el gasto cardiaco influirá el retorno venoso, la estimulación simpática, la estimulación vagal y la fuerza del miocardio. La resistencia vascular al flujo de la sangre guarda relación sobre todo con el diámetro interior del vaso, y son precisamente las pequeñas arterias y arteriolas (diámetro inferior a 1 mm) las que ofrecen mayor resistencia. Si las arteriolas están completamente dilatadas, son los grandes vasos los principales determinantes de esta resistencia.

La fisiología de la determinación de la PA es sorprendentemente simple. Siguiendo la ley de Ohm: la presión sanguínea es proporcional al impulso cardiaco y a la resistencia vascular al flujo de sangre.

En mayor o menor medida, un amplio rango de sistemas fisiológicos que tienen efectos pleiotrópicos e interactúan de forma compleja, influye en el control de la PA. Entre ellos se pueden citar:

- Los barorreceptores, que detectan los más pequeños cambios de presión en los vasos.
- Los péptidos natriuréticos producidos en el cerebro y en el corazón, en respuesta al incremento de presión en esos órganos.
- El sistema renina-angiotensina-aldosterona, el cual tiene influencia en la homeostasis del volumen vascular y en el tono vascular.
- El sistema quinina-caliceína, el cual afecta al tono vascular y al intercambio renal de sal.
- Los receptores adrenérgicos, los cuales tienen influencia en la frecuencia cardiaca y en la contracción.
- Y los factores producidos por los vasos sanguíneos que causan vasodilatación como el óxido nítrico, o contracción, como la endotelina.

Todos estos sistemas son integrados de tal modo que se asegura una perfusión adecuada a todos los tejidos, a pesar de la gran variedad en la demanda metabólica de los mismos.

Mientras que se ha establecido el papel de los sistemas fisiológicos para repuestas homeostáticas a corto plazo, la determinación de cómo estas rutas contribuyen a largo plazo a la presión sanguínea ha sido mucho más difícil. Dado que la PA sólo puede medirse en organismos vivos intactos, en los que todos estos sistemas fisiológicos interactúan de forma compleja, distinguir las alteraciones primarias de las secundarias adaptativas ha resultado muy difícil. Como resultado, las anomalías que subyacen bajo la variación de la PA permanecen desconocidas. Este hecho ha motivado una aproximación molecular a la variación de la PA desde hace un par de décadas. Hay múltiples evidencias que fundamentan la influencia genética en la PA. Los estudios en gemelos han documentado una mayor concordancia de la PA en monozigóticos que en dizigóticos (Feinleib y col., 1977) y los estudios de población demuestran que hay mayor parecido en los valores de PA entre individuos de la misma familia que entre los de distintas familias. Esta agregación familiar de la PA no es atribuible únicamente al efecto de los factores ambientales, ya que los estudios de adopción han demostrado mayor concordancia entre los descendientes biológicos que entre los adoptados que viven en el mismo hogar (Biron y col., 1976).

La investigación de formas mendelianas de hipertensión arterial (HTA) ha sido muy exitosa. Sin embargo, estos síndromes son extremadamente raros y representan una fracción muy pequeña en la variación de la PA en la población general.

1.4. HIPERTENSIÓN ARTERIAL

La elevación de la PA o HTA es un problema de salud pública que afecta al 25 % de la población adulta en las sociedades industrializadas (Burt y col., 1995), y es uno de los principales factores de riesgo independiente para el infarto, accidente cerebro-vascular (ACV) y la enfermedad renal (Lifton, 1996; Kannel, 2000). En España, las cifras que se han barajado en cuanto a la prevalencia de la

enfermedad no son distintas a las anteriores. Con criterios actuales incluso podrían alcanzarse valores de prevalencia del 30-35 % (Valbona y Pardell, 1993).

La Organización Mundial de la Salud (OMS) define HTA como una elevación crónica de la presión sanguínea sistólica, diastólica o de ambas, en las arterias (OMS, 1978). Las clasificaciones de HTA han variado a lo largo de los años, aunque a continuación se exponen las utilizadas de forma más frecuente en la práctica clínica actual (Tablas 1 y 2).

Tabla 1. Clasificación de HTA de la OMS (WHO, 1993).

	PAS en mm Hg	PAD en mm Hg
Normotensión	< 140	< 90
HTA ligera	140-180	90-105
HTA dudosa (<i>borderline</i>)	140-160	90-95
HTA moderada y grave	> 180	> 105
HTA sistólica aislada	> 140	< 90
HSA limítrofe	140-160	< 90

HTA= Hipertensión arterial; PAS= Presión arterial sistólica;

PAD= Presión arterial diastólica; HSA= Hipertensión sistólica aislada.

La Tabla que se presenta a continuación fue elaborada en el año 1997 por el *Joint National Committee on Detection, Evaluation and Treatment of High Blood Pressure* (JNC VI, 1997), y es de actualización periódica. Estos son los valores más usados en el diagnóstico de HTA.

Tabla 2. Clasificación de HTA (JNC VI, 1997).

	PAS en mm Hg	PAD en mm Hg
Óptima	<120 y	<80
Normal*	<130 y	<85
Normal Alta	130-139 o	85-89
HIPERTENSION**		
HTA ligera (estadio 1)	140-159 o	90-99
HTA moderada (estadio 2)	160-179 o	100-109
HTA severa (estadio 3)	180 o	110

HTA= hipertensión arterial; PAS= presión arterial sistólica;

PAD= presión arterial diastólica; *Sin medicación antihipertensiva ni ayuda; tal como dieta ejercicio, etc.

**Cuando la PAS y PAD de un paciente no coincidan en la misma categoría, se considerará la categoría superior para definir el estadio.

1.5. CARÁCTER CUANTITATIVO DE LA PRESIÓN ARTERIAL

La PA está regulada, o al menos influenciada, por muchos factores genéticos y ambientales, interacciones gen-gen y gen-factores ambientales. Conocer si estos factores son individuales, familiares, poblacionales, o de especie, es fundamental para comprender la influencia de los factores moleculares en la regulación de la PA (James y Baker, 1995). La PA es una variable biológica cuantitativa continua, y su distribución es de tipo normal o gaussiana. Por ello, establecer los límites entre normalidad y enfermedad, como se ha comentado, es arbitrario, aunque obedece a criterios basados en el riesgo de discapacidad y muerte asociados a los distintos niveles de PA.

Como variable cuantitativa, en términos genéticos la PA es un ejemplo de rasgo complejo, multifactorial y poligénico. Es probable que haya varios genes causales, los cuales en forma aditiva contribuyen entre el 30 y el 50 % a la variación de la PA entre individuos (Ward, 1995). Estos factores genéticos interactúan con factores medioambientales (por ejemplo la ingesta de sal en la dieta) hasta producir finalmente el fenotipo "enfermo". Sin embargo, la PA no es un rasgo cuantitativo del mismo modo en que lo es la estatura, pues al contrario que ésta, la PA se mantiene en un equilibrio estable a través de una compensación constante entre los factores estructurales y hormonales.

El concepto de que cada persona tiene una PA constante no es válido. Un mismo individuo tiene distintas PA no ya cada día, sino cada minuto. Lo recomendable es realizar varias tomas de PA durante un periodo de tiempo concreto, y obtener una media de las presiones sistólicas y diastólicas. Los individuos a los cuales se les ha medido de esta forma la PA y han dado como resultado una PA elevada sin conocer ninguna causa específica para ello, se considera que padecen hipertensión esencial.

1.6. FACTORES REGULADORES DE LA PRESIÓN ARTERIAL

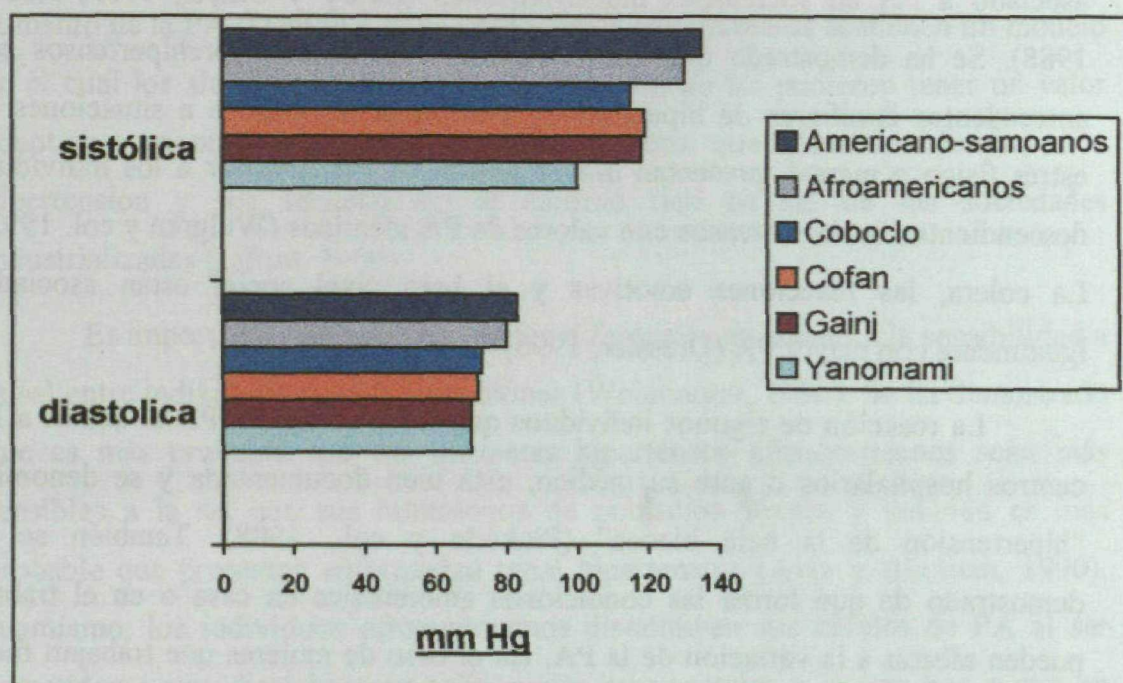
1.6.1. Factores ambientales

Las actuales evidencias sugieren que en cualquier población, la típica variación continua de la PA es el resultado de la interacción de fenotipos intermedios (entre los que pueden destacarse un cotransporte de sodio-litio aumentado, niveles altos de renina o de enzima convertidora de la angiotensina, lípidos en sangre, etc.) con su correspondiente componente genético actuando además en conjunto con factores ambientales. Algunos de esos factores ambientales son transmitidos socioculturalmente dentro de las familias, por lo que, en cierto modo, también son hereditarios (Williams y col., 1991; Ward, 1995).

Una estrategia para identificar el papel de los factores genéticos y de los factores ambientales es evaluar la distribución de la PA en grupos genéticamente distintos. La comparación de la distribución de la presión sanguínea entre diferentes grupos étnicos, ha proporcionado alguna de las evidencias más fuertes sobre la influencia de los factores socioculturales y ambientales. Ya en las primeras series de estudios epidemiológicos sobre presión sanguínea entre poblaciones se pudo observar esta influencia. A diferencia de las poblaciones blancas de Europa y Estados Unidos, la hipertensión esencial es muy rara en sociedades africanas. La edad es un fuerte factor predictivo de la PA en la mayoría de las muestras estudiadas de las sociedades más cosmopolitas o industrializadas, incluyendo afroamericanos, europeo-americanos, europeo-australianos y europeo-londinenses. Sin embargo, la edad está muy poco asociada con la PA en grupos que todavía continúan con un estilo de vida tradicional, como por ejemplo los yanomami, los gaing y los cofán (Rose y Stamler, 1989; Crews y col., 1991; Harper y col., 1994; Cooper y col., 1997a). En muchos grupos en transición que se encuentran experimentando rápidos cambios socioculturales, la edad y la PA también tienden a covariar, como ejemplo los caboclo de Brasil (Silva y col. 1995) y los americano-samoanos (Crews, 1998a) (Figura 3).

Figura 3. Variación poblacional en PA sistólica y diastólica.

Comparación entre 6 poblaciones.



De igual forma, las asociaciones de la PA y medidas corporales tales como el índice de masa corporal (IMC), peso, grosor de pliegues cutáneos e índice cintura cadera, son similares entre poblaciones y entornos medioambientales (Crews, 1998b).

Está aceptado que varios factores ambientales como la dieta y el estrés, ejercen una gran influencia en la presión arterial. En la determinación genética de la PA los factores ambientales no son simplemente aditivos a los genéticos (Hamet, 1996, 1998). Esto se comprende teniendo en cuenta que el efecto de una variante alélica de cualquier gen depende del entorno en el que se expresa. Ello probablemente explicaría los resultados contradictorios en los estudios realizados en diversas poblaciones en cuanto al efecto de una determinada forma del gen. Un ejemplo, los individuos con la misma predisposición de PA a la sensibilidad a la sal tendrían distintos valores de PA dependiendo de la cantidad de sal en la dieta.

1.6.1.1. Estrés

El estrés es uno de los factores ambientales más importantes en cuanto a su influencia en la PA. Desde hace más de 20 años el estrés psicosocial se ha asociado a PA en sociedades industrializadas (Henry y Cassel, 1969; Henry, 1988). Se ha demostrado que los individuos hipertensos y prehipertensos con antecedentes familiares de hipertensión, cuando se les expone a situaciones de estrés físico o mental, presentan una respuesta de PA superior a los individuos descendientes de normotensos con valores de PA idénticos (Widgren y col. 1992). La cólera, las reacciones emotivas y el bajo nivel social están asociados igualmente con mayor PA (Dressler, 1996).

La reacción de algunos individuos que incrementan su PA al acudir a los centros hospitalarios o ante su médico, está bien documentada y se denomina "hipertensión de la bata blanca" (Pickering y col., 1988). También se ha demostrado de qué forma las condiciones ambientales en casa o en el trabajo pueden afectar a la variación de la PA. En el caso de mujeres que trabajan fuera de casa y tienen niños, los valores más altos de PA se registraban en la tarde cuando regresaban a su hogar; mientras que en mujeres trabajadoras sin niños, los niveles de PA más elevados se obtenían en el transcurso de su jornada laboral (James, 1991, James y Pickering, 1993).

1.6.1.2. Factores relacionados con la dieta

Ingesta de sodio

El contenido de sodio en la dieta es un factor ambiental significativo en la regulación de la PA. El estudio *Intersalt* (1988), demostró una correlación positiva entre la excreción de sodio y la PA sistólica y diastólica. Sacks y col. (2001) demuestran que la disminución en la ingesta de sodio disminuye considerablemente la PA, tanto en individuos normotensos como hipertensos. Los efectos en la disminución de la presión son aun mayores al combinar niveles más bajos de sodio con una dieta rica en frutas y verduras y pobre en grasas lácteas.

En sociedades primitivas que consumen poca sal en la dieta, la incidencia de hipertensión es baja. Ello podría tener una explicación evolutiva ya que nuestra especie apareció en el interior del África Sub-Sahariana, en un entorno

notablemente pobre en sal, donde se podría haber generado una fuerte presión de selección a favor de una avidez renal por la retención de sal y de agua. En experimentos recientes con primates africanos, a los cuales se les ha cambiado su dieta natural baja en sal por una dieta alta en sal, se ha observado un marcado aumento de la PA (Denton y col., 1995). Estos experimentos sostienen un modelo en el cual los alelos que promueven la retención de sal pudieron tener un valor adaptativo en nuestro ancestral entorno, mientras que ahora contribuyen a la hipertensión y sus secuelas en el entorno rico en sal de las sociedades industrializadas (Lifton, 1996).

Es importante destacar que existen diferencias en cuanto a la sensibilidad a la sal entre individuos y entre poblaciones (Weinberger, 1996). Se ha demostrado que es más probable que los pacientes hipertensos afroamericanos sean más sensibles a la sal que sus homólogos de población blanca y también es más probable que presenten enfermedad renal hipertensiva (Aviv y Aladjem, 1990). Asimismo, los individuos afroamericanos disminuyen sus niveles de PA al ser sometidos a una dieta baja en solio y rica en vegetales a la vez que pobre en grasas lácteas, de forma más sustancial que los individuos blancos (Sacks y col., 2001).

Ingesta de Potasio

En el estudio anteriormente referido "Intersalt" (1988) apareció una asociación negativa entre la excreción urinaria de potasio en 24 h y la PA (una excreción urinaria de potasio mayor de 100 mmol se asoció con un descenso de 4,5 mmHg y 2,9 mmHg en la PA sistólica y diastólica, respectivamente), destacando que la relación entre PA y el índice sodio/potasio urinario es más fuerte que la relación con cualquiera de ellos por separado.

Obesidad

La obesidad, la resistencia a la insulina y la dislipemia, son situaciones metabólicas aparentemente implicadas en la patogenia de la hipertensión esencial. Hay evidencias ciertas de que el peso corporal y la PA están íntimamente relacionados (Spiegelman y col., 1992; Cooper y col., 1997b, 1998; Rankinen y col., 1999). Todos los aspectos relacionados con las medidas corporales tales como el peso, grosor de pliegues cutáneos, índice de masa corporal e índice

cintura/cadera se encuentran asociados positivamente con la PA (Hamet y col., 1998; Crews y Williams, 1999). Así pues, al modificar las condiciones ambientales, como al inicio de una dieta hipocalórica que conduce a la pérdida de peso, se produce un descenso significativo de la PA. En pacientes hipertensos obesos, la reducción de la grasa visceral intra-abdominal está más relacionada con la disminución de la PA que la pérdida de peso corporal total (Kanai y col., 1990). Los pacientes con HTA y obesidad con frecuencia presentan intolerancia a la glucosa y dislipemia. Se ha sugerido que existe un síndrome de hipertensión dislipémica familiar, caracterizado por concentraciones elevadas de colesterol transportado en lipoproteínas de baja densidad (LDL-colesterol) y triglicéridos, y por una concentración baja de colesterol transportado en lipoproteínas de alta densidad (HDL-colesterol), además de un inicio de hipertensión antes de los 60 años. Se cree que un vínculo fisiopatológico común en estos fenotipos es la resistencia a la insulina, la hiperinsulinemia o ambas. Tanto una como otra, así como la dislipemia asociada, aparecen en la descendencia de padres hipertensos, no diabéticos, antes que se evidencie hipertensión y cualquier aumento de peso (Williams y col., 1988; Schmidt y col., 1996).

Se cree que la resistencia a la insulina predispone a los individuos a un aumento del tono vascular por varios mecanismos: disminución del efecto de la insulina de reducción de las concentraciones intracelulares de calcio (baja actividad de las bombas Na^+/K^+ y Ca^{2+} , ATPasa); Aumento de la sensibilidad vascular a los presores, y descenso en la producción del óxido nítrico derivado del endotelio o un incremento de la endotelina (Zanchi y col., 2000; Thomas y col., 2001;). Se ha propuesto que la disfunción endotelial es un componente integral del síndrome de resistencia a la insulina, independiente de la hiperglucemia, yendo más lejos, al sugerir que la disfunción endotelial empeora la resistencia a la insulina y predispone a los individuos a padecer la enfermedad macrovascular (Raij, 2001).

1.7. BASES GENÉTICAS DE LA PRESIÓN ARTERIAL

1.7.1. Historia

Ya en 1761 Morganini observó que la mayoría de sus pacientes con PA alta, tenían una historia familiar en la que aparecía un exceso de muertes por enfermedades cardíacas o accidentes vasculares cerebrales (Morganini, 1761). Hasta casi 100 años después, cuando se desarrollaron los instrumentos de medición de la PA, no aumentó el interés por la clínica de la PA.

A principios del siglo XX, Weitz (1923) estableció por primera vez que el riesgo de penetración genética dependía de la edad. Veinte años después se comenzó a tener la idea de que un aumento en la PA, era un factor de riesgo fundamental para la enfermedad coronaria y la mortalidad precoz (Bechgaard, 1946).

En 1947 Platt, afirmó que la HTA estaba causada por la herencia de un gen dominante. Sus estudios iniciales y otros similares concluían que la HTA era debida a un solo gen, pero pronto se evidenció que esos estudios tenían fallos de diseño. Estos trabajos pioneros se centraban en la distribución de la HTA en familiares de individuos hipertensos que tenían a su vez unas PA muy elevadas. A menudo se utilizaba la muerte cardiovascular en sustitución de la HTA en generaciones previas, así se exacerbaba la asociación familiar con HTA. De este modo concluían que la HTA se trataba de una enfermedad monogénica (Platt 1947; Zanchetti, 1986). Anteriormente se había evaluado la distribución de la PA dentro de familias que eran representativas de la población general. Con estos supuestos Ayman (1934) fue el primero en postular que la HTA era debida a más de un gen.

Hamilton y col. (1954a,b,c) realizaron el estudio "St. Mary" que supuso un avance fundamental en la epidemiología genética. Por un lado diseñaron el trabajo basándose en el concepto de que la PA era un rasgo cuantitativo, incluyendo un gran número de individuos que eran representativos de la distribución de la PA en la población general, y ajustando los análisis estadísticos según la edad y el sexo. Por último adoptaron la aproximación biométrica de la "genética cuantitativa"

para definir la relación entre PA familiar en términos estadísticos estándar. La conclusión fue que lo que se heredaba no era la HTA en sí, sino la media del valor de PA de un individuo. Así, la herencia de la PA se parecía a un carácter cuantitativo de distribución continua, y no a un rasgo mendeliano concreto. Otros trabajos realizados a finales de los 50 reafirmaron que la PA se heredaba de forma cuantitativa y además se introdujo el concepto de que la asociación familiar de la PA estaba determinada por la influencia de factores genéticos y ambientales (Miall, 1956; Miall y Oldham, 1958).

Durante los años sesenta se produjo un acalorado debate entre Sir George Pickering y Sir Robert Platt en torno a si la HTA es el extremo superior cuantitativo de una distribución continua de la PA y, por tanto, determinada por una serie de genes, o bien es un rasgo cualitativo debido al efecto de un único gen (Pickering, 1967; Platt, 1967). Se podría decir que ambos tenían razón, ya que, aunque se han identificado varias formas monogénicas de hipertensión que se comentarán a continuación, hoy día entendemos la hipertensión esencial como una enfermedad poligénica con interacciones "gen-gen y "gen-entorno".

1.7.2. Polimorfismos genéticos

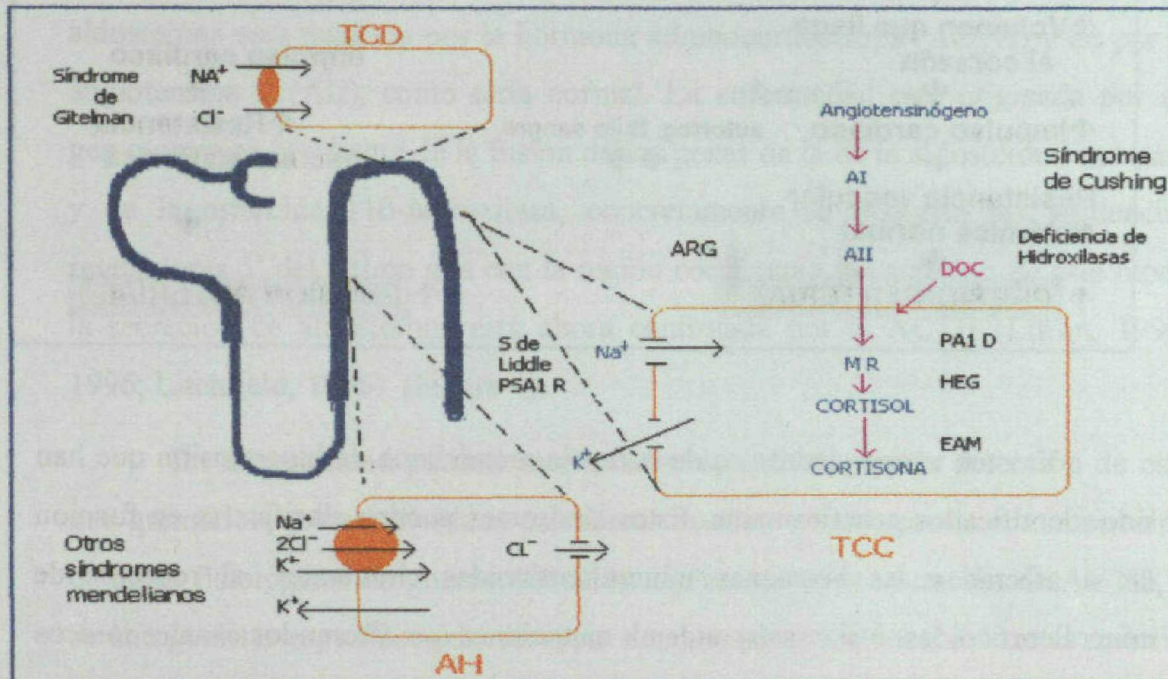
El término polimorfismo se refiere a la presencia de dos o más formas de un gen en una población, con una frecuencia igual o superior al 1%. La variación genética da lugar a diferentes alelos que son las posibles formas alternativas de un gen. Un polimorfismo puede determinar o no diferencias fenotípicas, además de constituir en ocasiones marcadores moleculares de utilidad clínica. Los cambios en la secuencia de ADN pueden producirse en regiones codificantes (exones) o no codificantes (intrones, regiones reguladoras, ADN repetitivo, ADN espaciador, etc.).

1.7.3. Formas mendelianas de hipertensión

Se han identificado mutaciones en 8 genes que causan formas mendelianas de hipertensión y 9 genes que causan formas mendelianas de hipotensión en humanos. Estos genes tienen efectos muy amplios en la presión sanguínea. Dada

la diversidad de sistemas fisiológicos que afectan a la PA es sorprendente que el gen mutado afecte, en casi todos los casos, la reabsorción neta de sal en el riñón. Las mutaciones que incrementan la reabsorción de sal elevan la PA, mientras que aquellas que disminuyen su reabsorción bajan la PA (Figura 4).

Figura 4. Mecanismos moleculares que median la reabsorción NaCl en las células renales y localización de mutaciones que originan síndromes hipertensivos e hipotensivos.



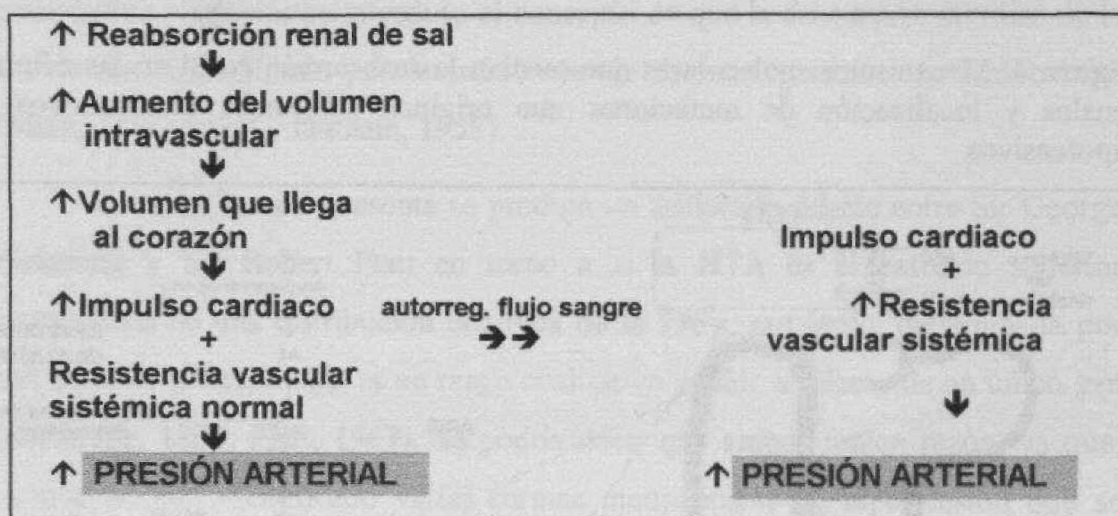
AH: segmento grueso del asa de Henle; TCD: túbulo contorneado distal; TCC: túbulo colector cortical. DOC: desoxicorticosterona.

Síndromes hipertensivos: síndrome de Liddle; síndrome de Cushing; ARG: aldosteronismo remediable por glucocorticoides; HEG: hipertensión exacerbada en la gestación; EAM: exceso aparente de mineralocorticoides. Síndromes hipotensivos: síndrome de Gitelman; PSA1: pseudoaldosteronismo tipo 1, D dominante y R recesivo.

En algunos casos se han identificado mutaciones en el mismo gen que provocan ganancia o pérdida de función, con efectos opuestos en la PA. La relación fisiopatológica entre la sal y la presión sanguínea es consecuencia de la relación entre la sal y la homeostasis del volumen vascular. El incremento neto de la reabsorción renal de sal necesita el incremento de la reabsorción de agua, para mantener la concentración de sodio cercana a 140 mM. El resultado del aumento del volumen intravascular es que se incrementa el retorno venoso de sangre hacia el corazón, por lo tanto aumenta el impulso cardíaco y eso produce un aumento

directo de la PA. Contrariamente, si no hay reabsorción de sal se reduce el volumen sanguíneo y la PA (Figura 5).

Figura 5. Mecanismo de elevación de la PA a través de la reabsorción de sal.



Existen varios síndromes de herencia mendeliana de hipertensión que han sido identificados genéticamente. Estos síndromes pueden clasificarse en función de si afectan a las hormonas mineralcorticoides circulantes, al receptor de mineralcorticoides, o si corresponden a mutaciones que alteran los canales iónicos y transportadores renales (Figura 2).

- *Mutaciones que afectan a las hormonas mineralcorticoides circulantes:*

- Aldosteronismo remediable con glucocorticoides.
- Síndrome del exceso aparente de mineralcorticoides.

- *Mutaciones que afectan al receptor de mineralcorticoides:*

- Hipertensión exacerbada en la gestación.

- *Mutaciones que alteran los canales renales de iones y los transportadores:*

- Síndrome de Cushing.
- Síndrome de Liddle.

1.7.3.1. *Aldosteronismo reparable por glucocorticoides*

Este síndrome es una forma familiar de hipertensión autosómica dominante descrito por primera vez por Sutherland y col. (1966). Los individuos afectados muestran hipertensión moderada o grave, detectada desde el nacimiento y su aumento es progresivo (a los 20 años los individuos suelen ya ser hipertensos). En estos pacientes la HTA es causada por una secreción constitutiva de aldosterona y tal vez una secreción adicional de hormonas mineralcorticoides adrenales. La característica principal de estos pacientes es que la secreción de aldosterona está regulada por la hormona adrenocorticotropa (ACTH) y no por la angiotensina II (AII), como sería normal. La enfermedad está originada por un gen quimérico resultante de la fusión de los genes de la de la aldosterona sintetasa y de la esteroide 11 β -hidroxilasa, concretamente se fusionan las secuencias reguladoras 5' del último gen con la región codificante del anterior, de este modo la secreción de aldosterona está ahora controlada por la ACTH (Lifton, 1992, 1996; Litchfield, 1995). (Figura 4).

En la actualidad pueden usarse tests específicos para la detección de este gen quimérico, y los individuos portadores pueden tratarse con la administración de dosis fisiológicas de glucocorticoides supresores de la secreción de ACTH, o de antagonistas específicos del receptor de mineralcorticoides o del canal epitelial del sodio (Pascoe y col., 1992).

1.7.3.2. *Síndrome del exceso aparente de mineralcorticoides*

Es un síndrome autosómico recesivo caracterizado por el establecimiento de una HTA entre moderada y severa (Mune y col., 1995), causada por la estimulación del receptor de mineralcorticoides. Los pacientes presentan niveles muy bajos de aldosterona. Una exhaustiva búsqueda del mineralcorticoide responsable de la HTA en estos pacientes, dio como resultado un hallazgo sorprendente: se trataba de la hormona glucocorticoide cortisol. El cortisol normalmente circula a concentraciones que son varios órdenes de magnitud mayores que las de aldosterona, este hecho sugiere la existencia de un mecanismo que evite que el cortisol active el receptor de los mineralcorticoides *in vivo*. Las células que responden selectivamente a mineralcorticoides contienen la enzima

11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa, que metaboliza el cortisol a cortisona, un esteroide incapaz de activar el receptor de mineralcorticoides. Este mecanismo "protege" al receptor de mineralcorticoides del cortisol, resultando ser así selectivo para su activación por aldosterona (Stewart y col., 1987; Funder, 1988) (Figura 4).

Al observar que el cortisol tenía alargada de forma significativa su vida media en el plasma de los pacientes afectados por el síndrome del exceso aparente de mineralcorticoides, y que la orina de estos pacientes mostraba una sorprendente elevación de la *ratio* de los metabolitos del cortisol a metabolitos de cortisona, se supuso que estos pacientes tenían una deficiencia en la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa (Stewart y col., 1987; Funder 1988).

1.7.3.3. Hipertensión exacerbada en la gestación

Una mutación en el dominio de unión al ligando del receptor de mineralcorticoides, causa una forma autosómica dominante de HTA que se agudiza de forma muy marcada en la gestación (Geller y col., 2000). Consiste en una mutación sin sentido denominada MR S810L. Los portadores desarrollan hipertensión antes de la edad de 20 años. El receptor muestra activación parcial en ausencia de esteroides pero, sin embargo, presenta una activación normal por aldosterona. Sorprendentemente, los compuestos que normalmente se unen pero no activan el receptor son potentes agonistas del receptor mutante. Entre estos está la progesterona. Puesto que ésta se eleva durante la gestación, se ha sugerido que las pacientes con la mutación desarrollan hipertensión durante el periodo de gestación. Es más, las pacientes gestantes que portan esta mutación tienen complicaciones severas por un aumento dramático de HTA asociado con una supresión completa del sistema renina angiotensina (Geller y col., 2000) (Figura 4).

1.7.3.4. Síndrome de Cushing

Este síndrome autosómico recesivo está causado por la incapacidad de la enzima 11 β -hidroxiesteroide deshidrogenasa para metabolizar el cortisol. También se ha identificado una resistencia a glucocorticoides causada por una

mutación en el receptor de glucocorticoides (Ulick y col., 1992; Karl y col., 1993). En este síndrome se observan elevaciones de la *ratio* cortisol/cortisona y de los efectos característicos de los mineralcorticoides: supresión de la actividad de la renina plasmática y de los niveles de aldosterona, disminución de los niveles de potasio sérico, y elevación de los niveles de bicarbonato (Figura 4).

1.5.3.5. *Síndrome de Liddle*

Los pacientes con este síndrome, de herencia autosómica dominante, presentan una HTA de moderada a severa. La patogénesis de HTA en este síndrome implica un incremento en la reabsorción renal de sal y de agua. Sin embargo, en contraste con los otros síndromes, los antagonistas de los receptores de mineralcorticoides no tienen efecto en la PA. El trasplante renal corrige el defecto en estos pacientes, lo cual sugiere que el defecto en estos individuos es intrínseco al riñón (Botero-Vélez y col., 1994) (Figura 4).

Los análisis genéticos han localizado el gen causal del síndrome de Liddle en un pequeño segmento del cromosoma 16 (Shimkets y col., 1994; Hansson y col., 1995a). Este segmento contiene dos genes de particular interés, que codifican las subunidades β y γ del canal epitelial de sodio (ENaC) sensible a amiloide. Este canal está compuesto de al menos tres subunidades y la actividad normal del canal requiere del concurso de las tres. La subunidad α se encuentra codificada en el cromosoma 12. El examen de estos genes en los pacientes con la enfermedad ha revelado mutaciones que afectan a las subunidades β y γ del canal (Shimkets y col., 1994; Hansson y col., 1995a,b) (Figura 6). Estas mutaciones dan como resultado la delección de la región carboxilo-terminal citoplasmática de las subunidades, o la introducción de sustituciones en aminoácidos dentro de una región corta rica en prolinas de dicha región carboxilo-terminal. La expresión en ovocitos de *Xenopus* del ENaC conteniendo estas subunidades mutantes, provoca un incremento muy marcado del sodio celular total (Hansson y col., 1995b). Este incremento de la actividad *in vivo* conduce a un aumento de la reabsorción de sodio y explica la hipertensión que presentan estos pacientes. Parece que estas mutaciones dan como resultado una incapacidad para eliminar los canales activos

de la superficie apical de la célula; una función que debe ser mediada por otra proteína de enlace con los segmentos ricos en prolina. (Hansson y col., 1995a).

1.7.4. Formas mendelianas de hipotensión

1.7.4.1. *Pseudohipoaldosteronismo tipo 1 (PHA-1)*

Es un síndrome autosómico-recesivo, que se caracteriza por una deshidratación grave en el periodo neonatal, importante hipotensión, pérdida de sal, altos niveles de potasio sérico, acidosis metabólica y una significativa elevación de la renina plasmática y de los niveles de aldosterona. Los análisis genéticos de la descendencia de enlaces consanguíneos demuestran la relación de esta enfermedad con segmentos de los cromosomas 12 y/o 16, que codifican las diferentes subunidades de ENaC; el mismo canal alterado en pacientes con el síndrome de Liddle (Strautnieks y col., 1996; Chang y col., 1996). El examen de las subunidades de este canal en pacientes con PHA-1, revelan mutaciones que, en lugar de activar ENaC (como ocurre en la enfermedad de Liddle), provocan pérdida de función de estos canales. Se produce entonces un derroche en la excreción de sal, acompañado por un efecto secundario en la excreción de iones de potasio e hidrógeno. Estos factores estimulan la actividad del sistema renina-angiotensina, aunque la reabsorción de sal no puede incrementarse debido a la mutación que convierte a ENaC en un canal defectuoso (Figuras 4 y 6).

1.7.4.2. *Síndrome de Gitelman*

Al igual que el anterior, este síndrome es autosómico-recesivo y se caracteriza por distintas manifestaciones clínicas y fisiológicas. Estos pacientes tienen una PA baja y frecuentemente manifiestan anormalidades neuromusculares (Gitelman y col., 1966). El gen causante de esta enfermedad ha sido mapeado en una región del cromosoma 16 que incluye el gen que codifica el cotransportador renal Na-Cl sensible a tiazida (Simon y col., 1996). Este transportador de iones se localiza en la membrana apical del epitelio del túbulo renal, en la parte distal del túbulo, y media la reabsorción electroneutral de sodio y cloro (Gamba y col., 1994). Los pacientes muestran diversas mutaciones, tales como terminaciones

prematuras de la traducción y alteraciones en el procesamiento de intrones (*splicing*), del gen del cotransportador de Na-Cl que cosegrega con la enfermedad. El resultado es la pérdida de la función del cotransportador (Figura 7). Este hallazgo demuestra que el principal defecto en estos pacientes es la excreción masiva de sal. Las otras manifestaciones de esta enfermedad derivan de dicha anomalía principal (Figuras 4 y 7).

Figura 6. Localización de las mutaciones en las tres subunidades del ENaC, en los síndromes de Liddle (rojo) y PHA-I (azul).

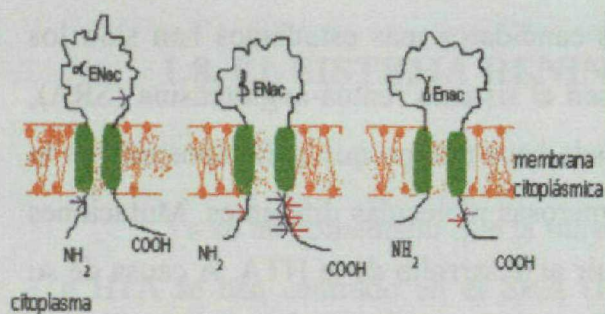
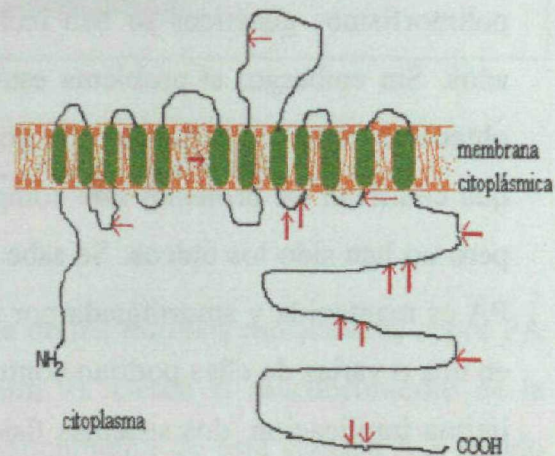


Figura 7. Localización de las mutaciones en el cotransportador Na-Cl en el síndrome de Gitelman



1.7.5. Hipertensión esencial

En la gran mayoría de pacientes con PA elevada (95%) la causa permanece sin identificar. A estos pacientes se les diagnostica de hipertensión esencial. En el 50 % de estos pacientes se falla al intervenir médicamente para disminuir su PA y al tratar de revertir sus alteraciones cardíacas o vasculares (Brown, 1997).

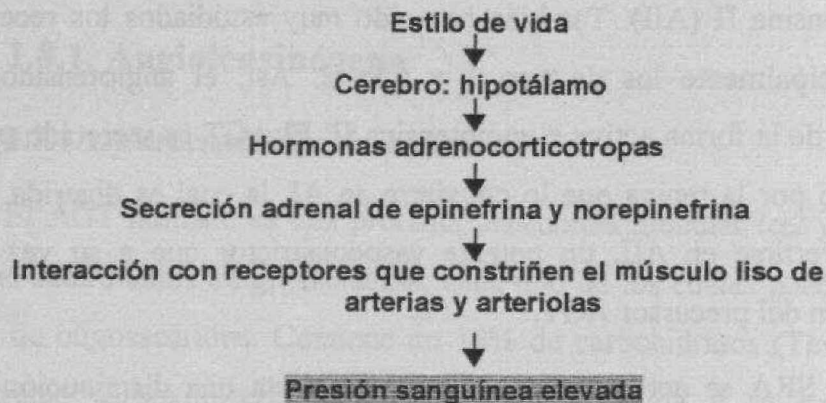
Se han hecho esfuerzos muy considerables para identificar los genes responsables del desarrollo de la HTA esencial; una tarea muy difícil por multitud de razones. La heredabilidad de la HTA es baja. Los estudios en familias y gemelos demuestran que sólo una pequeña parte de la variación de la PA (aproximadamente el 30%) puede ser atribuida a factores genéticos, mientras que al menos un 50% es debido a factores ambientales (Corvol y col., 1997).

La HTA es una definición arbitraria de un suceso fisiológico que ocasionalmente aparece relativamente tarde en la vida. Poco sabemos sobre el número total de genes implicados, su modo de transmisión, sus efectos cuantitativos sobre la PA, sus interacciones con otros genes, o su modulación por factores ambientales. La estrategia más frecuente que han seguido los grupos que trabajan en la genética molecular de la hipertensión humana ha consistido en el estudio de los genes candidatos que podrían contribuir a la regulación de la presión sanguínea.

Los estudios diseñados para buscar asociaciones de la HTA con polimorfismos genéticos se han incrementado exponencialmente en los últimos años. Sin embargo, el problema está lejos de ser resuelto porque los resultados obtenidos son muy dispares. Los genes candidatos más estudiados han sido los que codifican las proteínas que componen el sistema renina-angiotensina (SRA), pero no han sido los únicos. Se sabe desde hace tiempo que la homeostasis de la PA es mantenida y amortiguada por numerosas moléculas diferentes. Mutaciones en una o varias de ellas podrían contribuir al desarrollo de la HTA. A causa de su íntima implicación, dos sistemas fisiológicos principales han llevado a acometer estudios genéticos sobre la regulación de la PA: el sistema simpático-adrenal-medular (SAM) y el ya mencionado SRA.

El SAM regula la constricción arteriolar y la acción del músculo liso a través de la secreción de hormonas adreno-corticoides, tales como la epinefrina y la norepinefrina. Este sistema está también asociado a la respuesta emocional, la lucha y la huida, atributos fisiológicos que se asocian con el estrés. El estrés psicosocial continuado puede ser el precursor de una PA elevada. Una excitación de larga duración en este sistema conduce a un estado constante de alerta, por lo cual las acciones de la epinefrina y norepinefrina en las arteriolas y en las arterias causan una constricción constante y un incremento de la resistencia periférica que conlleva una elevación de la PA. Es pues importante considerar a los receptores de epinefrina y norepinefrina como candidatos posibles en la determinación de cómo el estrés psicosocial impacta en la presión sanguínea (Figura 8).

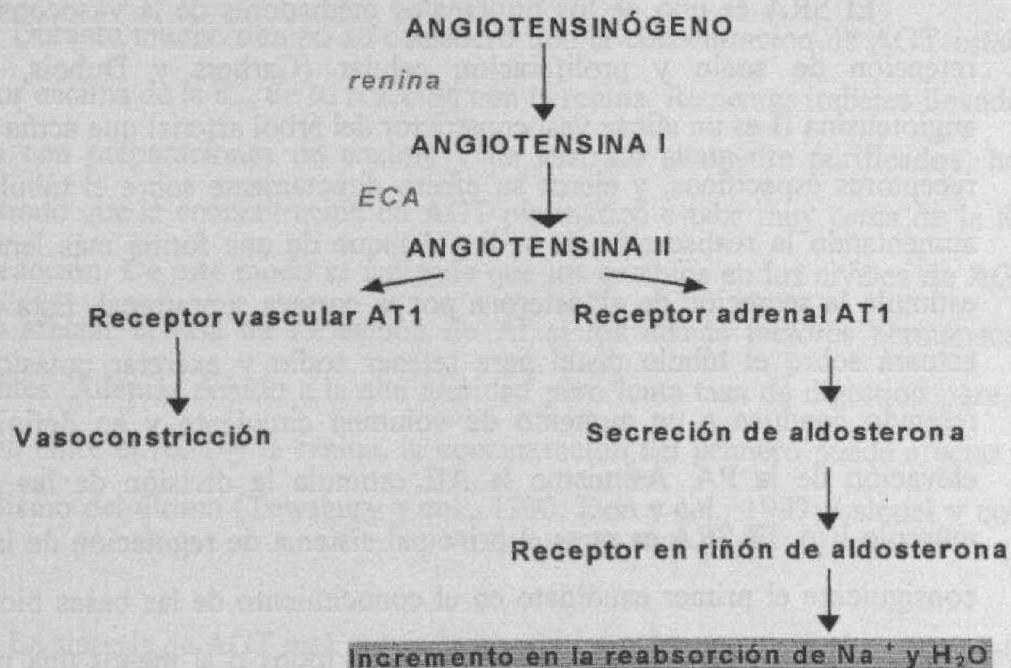
Figura 8 . Hipótesis de la asociación del estrés psicosocial, catecolaminas, y presión sanguínea.



1.8. EL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Ya se ha comentado que la mayoría de los estudios moleculares sobre PA e HTA se han centrado en el SRA (Figura 9). Desde el descubrimiento de la renina hace 80 años los avances en el conocimiento de este sistema han tenido enorme importancia.

Figura 9. Esquema del sistema renina-angiotensina



En este sistema se han identificado numerosas proteínas polimórficas con sus correspondientes *loci*. Entre ellas se encuentran el angiotensinógeno (AGT), la renina, la angiotensina I (AI), la enzima convertidora de la angiotensina (ECA) y la angiotensina II (AII). También han sido muy estudiados los receptores de la AII, principalmente los de tipo 1 y tipo 2. Así, el angiotensinógeno es un precursor de la forma activa o angiotensina II. El AGT es secretado por el hígado y digerido por la renina que lo convierte en AI, la cual es digerida por la ECA para convertirse en AII, un potente vasoconstrictor que a su vez estimula la producción del precursor AGT.

El SRA se activa cuando el riñón detecta una disminución en el flujo sanguíneo. El AGT se encuentra normalmente en niveles de aproximadamente 1mmol/L en el plasma humano, aunque la liberación de cualquier glucocorticoide o estrógeno de las glándulas adrenales o de los ovarios, induce la producción de AGT y aporta el substrato necesario para elevar los niveles de AII. Esto ocurre sin alterar ninguno de los niveles de renina o de ECA. Este hecho podría explicar en parte porqué ninguno de los polimorfismos moleculares del tipo RFLPs (*Restriction Fragment Length Polymorphisms*) estudiados de la renina, ni los polimorfismos Inserción/Delección de la ECA, que más adelante serán comentados, han mostrado una asociación fuerte con la PA en la mayoría de las poblaciones examinadas (Barley y col., 1991, 1994a; Crews, 1998a).

El SRA es uno de los principales mediadores de la vasoconstricción, la retención de sodio y proliferación celular (Garbers y Dubois, 1999). La angiotensina II es un eficaz vasoconstrictor del árbol arterial que actúa a través de receptores específicos, y ejerce su efecto directamente sobre el túbulo proximal aumentando la reabsorción de sodio. Aunque de una forma más lenta, también estimula la secreción de aldosterona por la corteza suprarrenal. Esta aldosterona actuará sobre el túbulo distal para retener sodio y excretar potasio. El sodio retenido conduce a un aumento de volumen circulante y en definitiva a una elevación de la PA. Asimismo la AII estimula la división de las células del músculo liso. El SRA es pues el principal sistema de regulación de la PA y por consiguiente el primer candidato en el conocimiento de las bases bioquímicas y genéticas de la HTA. Se ha demostrado que todos o al menos una parte de los

componentes del SRA están presentes en varios tejidos cruciales para mantener la homeostasis cardiovascular.

1.8.1. Angiotensinógeno

1.8.1.1. *Características de la proteína*

El AGT humano es una proteína plasmática globular (α_2 globulina), que contiene cuatro sitios de glicosilación, cada uno de los cuales puede unirse a una cadena de oligosacáridos. Contiene un 14% de carbohidratos (Tewsbury, 1983). Su extremo carboxilo-terminal (C-terminal) es serina y su extremo amino-terminal (N-terminal) es alanina ó ácido aspártico (Tewsbury y col., 1978). El peso molecular del AGT puede variar entre 55 y 65 Kda dependiendo del grado de glicosilación, de modo que esa variación corresponde principalmente a múltiples formas glicosiladas del AGT (Tewsbury, 1990; Jeunemaitre y col., 1995). El AGT puede ser considerado como la prohormona de la AI. Su procesamiento ocurre extracelularmente (Figura 10).

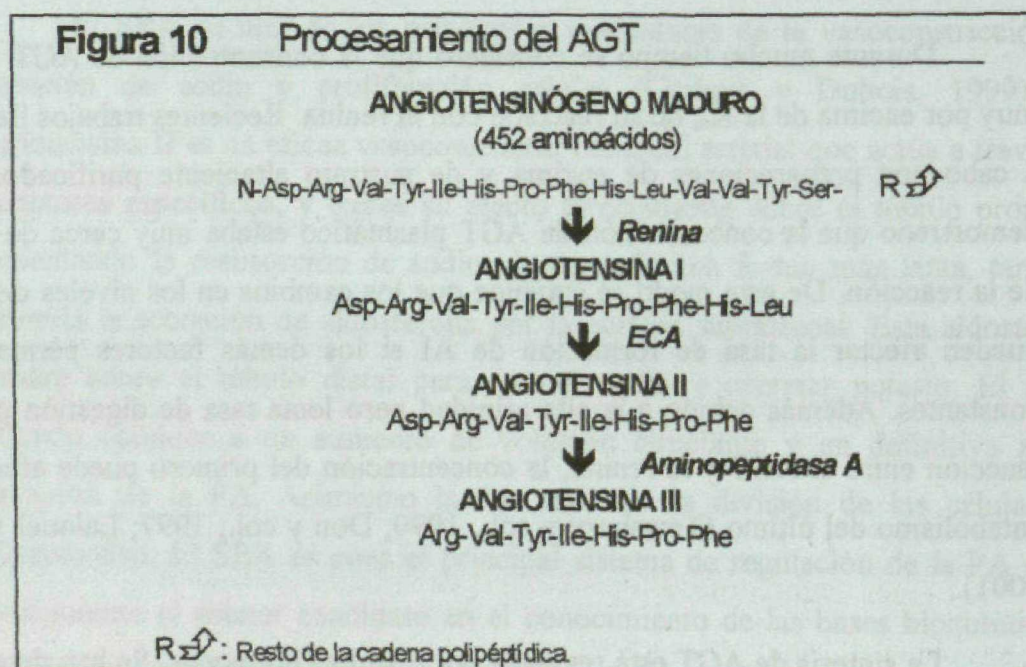
El AGT es el único sustrato de la renina, sintetizado principalmente por el hígado. Otros tejidos donde también puede sintetizarse el AGT, son el sistema nervioso central, el riñón, el corazón, el tejido vascular, las glándulas adrenales, los adipocitos y los leucocitos.

Durante mucho tiempo se consideró que la concentración de AGT estaba muy por encima de la K_m de su reacción con la renina. Recientes trabajos llevados a cabo con preparaciones de enzima y de sustrato altamente purificados, han demostrado que la concentración de AGT plasmático estaba muy cerca de la K_m de la reacción. De este modo se entiende que los cambios en los niveles de AGT pueden afectar la tasa de formación de AI si los demás factores permanecen constantes. Además debido a la alta afinidad pero lenta tasa de digestión para la reacción entre el AGT y la renina, la concentración del primero puede afectar el catabolismo del último (Tewsbury y col., 1990; Don y col., 1997; Lalouel y col., 2001).

La síntesis de AGT está regulada por distintas hormonas. Se han detectado niveles altos de AGT en estados como hipercorticismismo, embarazo, inflamación y

en terapia anticonceptiva; los niveles bajos se asocian con insuficiencia adrenal e inhibición de la ECA. Estas variaciones son debidas principalmente a modificaciones en su biosíntesis hepática, que se encuentra bajo control de factores hormonales tales como andrógenos, estrógenos, glucocorticoides, hormona tiroidea, insulina y AII.

Si se presupone que la tasa de formación de la AI es la mitad del máximo de concentración habitual de AGT plasmático, es lógico sospechar que la elevación del AGT al administrar estrógenos sintéticos o glucocorticoides, tenga que ver en la fisiopatología de algunas formas secundarias de hipertensión como la inducida por los anticonceptivos orales y el mencionado síndrome de Cushing (Jeunemaitre y col., 1995). También se ha observado un aumento del AGT en procesos infecciosos y de daño tisular, lo que se explica por el correspondiente incremento de los glucocorticoides endógenos que se produce en estos procesos. En el embarazo hay un incremento paralelo de los estrógenos y del AGT; ello ha hecho que se especule sobre su origen placentario. En sujetos normales un aumento del AGT causa elevación de la AII, que a su vez disminuye la secreción de renina para que la concentración de AII plasmática vuelva a ser normal. La AII ejerce una retroalimentación negativa sobre la síntesis del ARN mensajero (ARNm) del AGT, disminuyendo la producción de proteína.

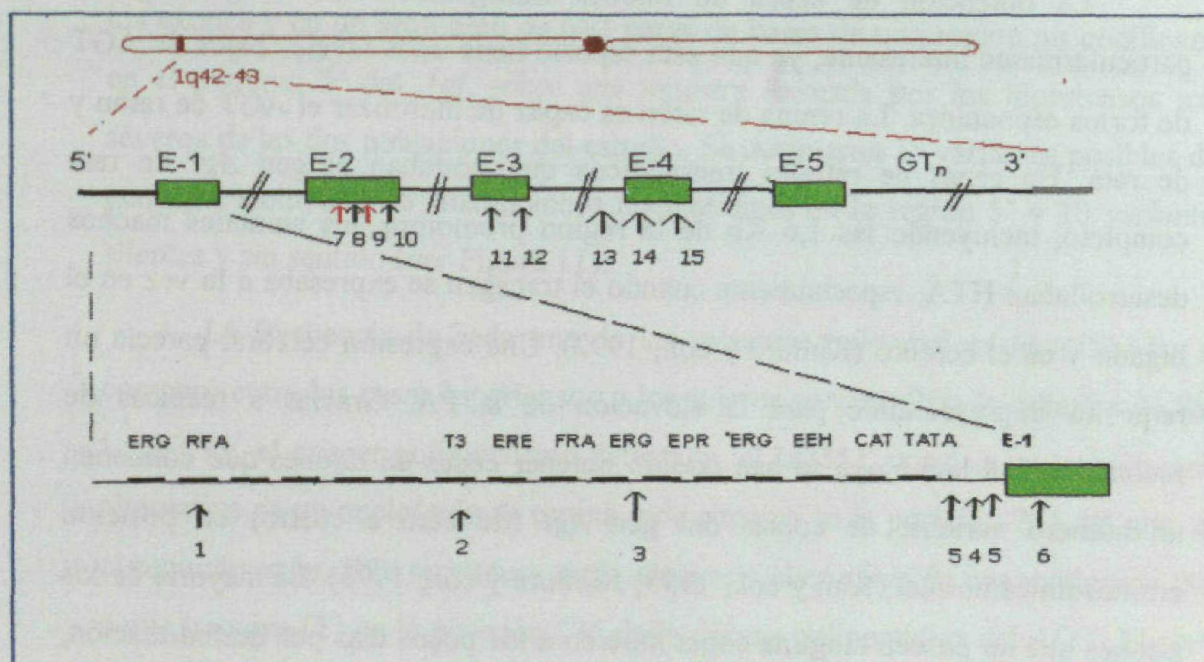


1.8.1.2. Estructura del gen

El gen del AGT (o gen *Agt*) fue secuenciado por Kageyama y col. (1984). Los datos obtenidos indican que el AGT maduro consta de 452 aminoácidos, con la secuencia de la angiotensina en su región N-terminal.

El gen se localiza en el brazo largo del cromosoma 1 humano (1q42-q43). Tiene un tamaño de 12 Kilobases, y está constituido por cinco exones y cuatro intrones y está presente en una sola copia (Gailard y col, 1989; Jeunemaitre y col., 1992a) (Figura 11).

Figura 11. Localización cromosómica y estructura del gen *Agt*.



E: exones; Elementos hormonales de respuesta a glucocorticoides: ERG; a estrógenos: ERE; a hormonas tiroideas: T3; FRA: factores de respuesta aguda; EEH: elementos específicos hepáticos; EPR: elementos promotores de la ARN polimerasa; CAT, TATA: Secuencias reguladoras de la transcripción

Las flechas indican las mutaciones detectadas en individuos hipertensos. En color rojo se indican las analizadas en el presente estudio. Las mutaciones 1, 4, 6, 7 y 11 corresponden a un cambio de una citosina por una timina; la 2, 3, 5, 12 y 15 al cambio de una guanina por una adenina; la 8 y 9 al cambio de una timina por una citosina; la 10 y la 13 de una adenina por una guanina; la 14 de una citosina por una adenina.

El gen *Agt* es homólogo a los genes de la α -1 antitripsina y de la antitrombina III. Se ha propuesto que estas proteínas, que pertenecen a la familia de las serpinas, derivan de un gen ancestral, siendo el *Agt* uno de los miembros más antiguos.

1.8.1.3. Papel del angiotensinógeno en el control de la PA.

Numerosas observaciones han permitido relacionar cambios en la concentración de AGT con PA (Walker y col., 1979). Otros estudios en ratas confirmaron la importancia de la concentración del sustrato de la renina en la síntesis de AI. El conocimiento del papel limitante del AGT en la formación de AI, se deriva del efecto de la inyección de AGT puro en ratas mantenidas con una dieta sin sal, en las que se detecta un aumento de la PA (Ménard y col., 1991). La inyección de anticuerpos anti-AGT entraña una bajada en la actividad de la renina plasmática, y una disminución de la PA en un grado que depende del estado del balance de sodio (Gardes y col., 1982).

La obtención de cepas de ratones transgénicos con el gen *Agt* es particularmente interesante, ya que esta especie tiene unos niveles bajos de AGT de forma espontánea. La renina de ratón es capaz de hidrolizar el AGT de ratón y de rata. En cepas de ratones transgénicos que portaban el gen *Agt* de rata completo, incluyendo las 1,6 Kb de la región promotora, los animales machos desarrollaban HTA, especialmente cuando el transgen se expresaba a la vez en el hígado y en el cerebro (Kimura y col., 1992). Una expresión cerebral parecía un requisito imprescindible para la elevación de la PA. Gracias a técnicas de recombinación homóloga se han podido obtener cepas de ratones que contienen un número variable de copias del gen *Agt* (de cero a cuatro) en posición cromosómica normal (Kim y col., 1995; Niimura y col., 1995). La mayoría de los ratones que no poseen ninguna copia mueren a los pocos días por deshidratación, lo que da idea de la importancia de un SRA funcional para la homeostasis del agua y de la sal. En los individuos que portaban una o más copias del gen *Agt*, los niveles plasmáticos de AGT aumentaban progresivamente en función del número de copias del gen, de forma que cada copia hacía subir alrededor de 8 mmHg la PA.

Imaginar una forma de hipertensión que dependa exclusivamente del AGT es difícil, ya que son muchos los factores que intervienen en la regulación de la PA, aunque en la literatura se describen dos casos excepcionales de hipertensión asociados a un tumor hepático secretor de AGT (Ueno y col., 1984; Kew y col., 1989). La regulación negativa ejercida por la AII sobre la secreción de la renina, sugiere que la autorregulación del SRA es predominante con respecto al efecto

directo de la concentración plasmática de AGT sobre la generación de angiotensina II.

Numerosos estudios epidemiológicos indican una relación positiva entre el AGT plasmático y la PA humana (Walker y col. 1979; Bloem y col., 1995). Un extenso trabajo realizado en 215 familias francesas y americanas ha permitido conocer el papel potencial del gen del AGT en la PA (Jeunemaitre y col., 1992a). Se analizaron dos series de familias hipertensas procedentes de Salt Lake City (Utah) y París, con un total de 379 pares de hermanos. Se observó asociación entre la HTA esencial y el locus del AGT. Esto sugería que las variantes moleculares en este gen podrían estar implicadas en la patogénesis de la hipertensión esencial. Se realizó una búsqueda directa de tales variantes en todos los exones y en un segmento de 682 pares de bases de una región no codificante en el extremo 5' del *Agt*, sobre una muestra formada por los hipertensos más severos de las dos poblaciones del estudio. Se detectaron 15 variantes posibles del gen *Agt*, incluyendo 5 sustituciones nucleotídicas en la región 5' y 10 variantes silentes y sin sentido (ver Figura 11).

La frecuencia de cada una de las variantes polimórficas identificadas se comparó entre los casos hipertensos y los sujetos control. Para la muestra de Salt Lake City, el primer polimorfismo detectado, el *M235T*, consiste en la existencia alternativa de un nucleótido de timina o de citosina en la posición 704 del gen, en el segundo exón. Ello se traduce en la presencia alternativa de una metionina (M) o una treonina (T) en la posición 235 de la cadena polipeptídica del AGT. El alelo *235T* era significativamente más frecuente en todos los casos hipertensos que en el grupo de los controles, con un incremento de su frecuencia asociado con la severidad de la HTA. Los mismos resultados se repitieron en la muestra de París. La asociación fue significativa en cada sexo. En particular, *235T* fue más prevalente en mujeres hipertensas. La frecuencia del alelo *235T* para los hipertensos de Salt Lake City y París fue de 0,49 y 0,52, respectivamente y de 0,36 y 0,38 en los normotensos de ambas poblaciones.

De los otros polimorfismos analizados, solamente el *T174M* mostró asociación significativa con HTA en ambas muestras, en concreto el alelo *174M*. Esta variante consiste en el cambio de un nucleótido de citosina por timina en la posición 521 del exón 2 del gen, lo que se traduce por el cambio de una treonina

(T) por una metionina (M) en la posición 174 de la proteína. Las frecuencias del alelo *174M* en hipertensos de Salt Lake City y París fueron de 0,18 y 0,17, respectivamente, y para los normotensos de ambas poblaciones fue de 0,8 en ambas.

El análisis de la distribución de los alelos *235T* y *174M* indica que estas dos variantes están en completo desequilibrio de ligamiento. Cuando se comparan las frecuencias de estos polimorfismos entre hipertensos y controles, los haplotipos con el *235T*, con o sin *174M*, se observaron con mayor frecuencia en los casos de hipertensos que en los controles, de forma estadísticamente significativa (Jeunemaitre y col., 1992a).

Más recientemente se han asociado otros polimorfismos en el promotor del gen *Agt* con aumento de la PA. La variante G-6A consiste en la sustitución de una adenina por una guanina en la posición -6, aguas arriba del lugar de inicio de la transcripción. Se ha demostrado, en experimentos *in vitro*, que la sustitución de la guanina por la adenina afecta a la transcripción basal del AGT (Inoue y col., 1997). Asimismo, la variante G-6A está en desequilibrio de ligamiento con la variante 235 del segundo exón (Inoue y col., 1997). En particular, y con escasas excepciones, *235T* aparece junto con adenina "A" en la posición -6, mientras que *235M* aparece con guanina "G" en esa posición -6 del promotor. Por ello, todas las asociaciones que se han reportado para el *235T* son extensibles al A(-6) (Lalouel y col., 2001). Esta posible asociación concuerda con la relación demostrada entre los polimorfismos en la posición 235 (concretamente con el alelo *235T*) y una mayor concentración de AGT en plasma (Jeunemaitre y col., 1992a; Ward y col., 1993; Bloem y col., 1995; Rotimi y col., 1997; Danser y col., 1998). Otras variantes halladas en el promotor, A-20C y C-18T parecen jugar un papel fundamental en la regulación de la transcripción del gen *Agt* (Sato y col., 1997).

También se deben mencionar otras raras mutaciones identificadas en el gen del AGT. Por un lado existe una mutación que afecta a la posición 10 de la proteína, cambiando una leucina por una fenilalanina. Esta mutación se encontró en heterozigosis en una mujer que presentaba una preclamsia (Inoue y col., 1995). La mutación se sitúa en el lugar en el que la renina hidroliza al AGT para formar la AI. Parece implicar una elevación de la síntesis de AII y, en consecuencia, una elevación de la PA. Inversamente, se conoce otra mutación en la posición 248 de

la proteína que tiene como consecuencia el cambio de una tirosina por una cisteína. Esta mutación se ha asociado a una disminución de la concentración plasmática de aproximadamente un 40% del AGT en los individuos portadores, y a una alteración de la secreción de la proteína *in vitro* (Giménez-Roqueplo y col., 1996).

1.8.1.4. Estudios de asociación

Una vez establecidos los polimorfismos asociados con la hipertensión esencial en el gen del AGT, se iniciaron numerosos estudios de estas variantes polimórficas localizadas en el segundo exón en diferentes poblaciones. Tras la primera asociación con las variantes 235 y 174 detectada por Jeunemaitre y col. (1992a), otros autores han mostrado una fuerte asociación entre variantes del gen del AGT y la HTA en caucasianos, afrocaribeños, mejico-americanos y japoneses (Caulfield y col., 1994, 1995; Atwood y col., 1997; Kato y col., 1999). Sin embargo, un extenso estudio europeo multicéntrico no ha hallado asociación entre el gen del AGT (alelo 235T) y la HTA (Brand y col., 1998). También ha sido fallida la búsqueda de esta asociación en población china (Niu y col., 1998). Cabe resaltar que los meta-análisis realizados concluyen la existencia de una débil pero significativa asociación entre el alelo 235T y la HTA (Kunz y col., 1997, Jeunemaitre y col., 1999; Staessen y col., 1999). El meta-análisis más reciente es el realizado por Staessen y col. (2001) y concluye que el polimorfismo 235T está asociado con la HTA.

1.8.2. Renina

1.8.2.1 Características de la proteína

La renina (E.C.3.4.99.19) es una enzima producida principalmente por el riñón, cuya principal función es hidrolizar el angiotensinógeno para liberar, a partir de su extremo amino, la AI (Figura 8). La mayor parte de la renina circulante se produce en el aparato yuxtaglomerular, donde unas células de la musculatura lisa de la arteriola aferente contienen unos gránulos densos a los electrones, que son en su mayoría sitios de almacenamiento de la renina.

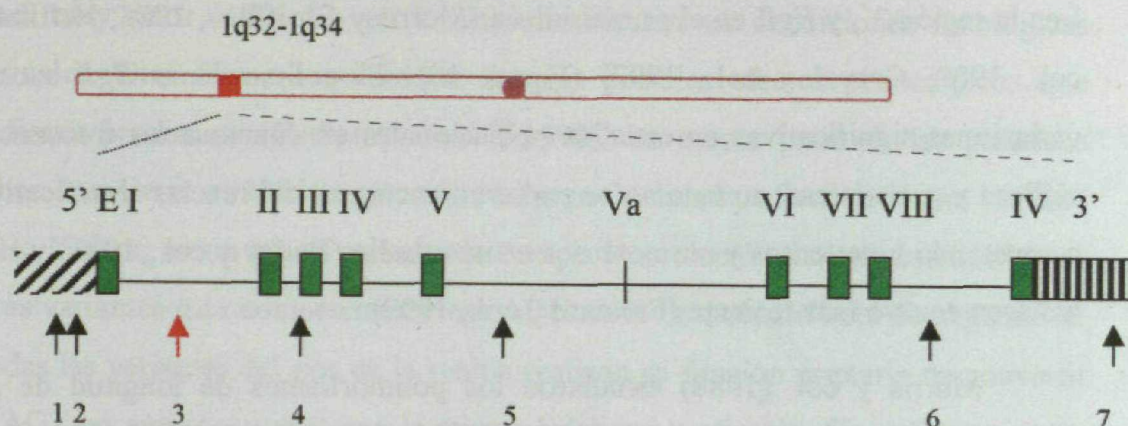
Este enzima se clasifica dentro de las proteasas del grupo aspartilo por su característica estructura primaria. Se cree que este grupo de enzimas derivan de un gen ancestral común mediante la duplicación del mismo. Esto explicaría su estructura con dos mitades iguales. Cada mitad tiene un residuo de ácido aspártico esencial para su actividad enzimática (Tang y Wong, 1987). Esta enzima tiene una especificidad inusual por el sustrato, de forma que el angiotensinógeno humano es resistente a la acción de reninas procedentes de otras especies. Esta elevada especificidad se debe a la presencia de una valina en lugar de una leucina en la posición 11 en la molécula del AGT según las especies (Burton y Quinn, 1986).

La renina es sintetizada como una prehormona grande. La preprorenina humana contiene 406 aminoácidos. La prorenina que se genera después de la eliminación de una secuencia principal de 23 aminoácidos del extremo amino (N)-terminal, contiene 383 residuos de aminoácidos. Después de la eliminación de la prosequencia del extremo N-terminal de la prorenina, la renina activa consiste en 340 aminoácidos. La prorenina tiene escasa actividad biológica.

La renina tiene una vida media en la circulación de 15-20 minutos y se metaboliza principalmente en el hígado, excepto una pequeña parte que lo hace en el riñón.

1.8.2.2. Estructura del gen

El gen de la renina (gen *Ren*) se encuentra en el brazo largo del cromosoma 1 (1q32-1q34), tiene un tamaño aproximado de 12 kilobases y está formado por 10 exones y 9 intrones (Figura 12).

Figura 12. Localización cromosómica y estructura del gen *Ren*

E: exones

Las flechas indican las mutaciones detectadas en individuos hipertensos. Se indica en color rojo la analizada en el presente estudio; Mutaciones: 1=Taql; 2= Hind III; 3= BglI; 4= BglII; 5=BglII; 6=Hind III; 7= Hind I

1.8.2.3. Estudios de asociación

Los estudios en ratas mostraron en primer lugar que existía una asociación entre las variantes en el gen *Ren* y la HTA. Varios estudios han relacionado este gen con formas experimentales de hipertensión. En ratas Dahl se demostró la existencia de una variante del gen de la renina que cosegregaba con HTA. Hay dos estirpes de ratas Dahl: unas padecen hipertensión cuando se les alimenta con una dieta rica en sal y otras no sufren alteración de la presión arterial aun cuando ingieran gran cantidad de sal. Se comprobó que un fragmento de 27 Kb del gen de la renina está asociado con la hipertensión inducida por la sal. Cada copia de este alelo se manifestaba con un incremento de PA de 10mmHg aproximadamente (Rapp y col., 1989). En otra estirpe de ratas, la presencia de una delección en el primer intrón del gen de la renina se asocia con HTA (Pravanec y col., 1991).

Se ha demostrado en algunos estudios que no existía asociación entre presión sanguínea y actividad de la renina en plasma (Barley y col., 1991; Jeunemaitre y col., 1992b).

Los análisis del gen humano de la renina no han obtenido resultados tan claros en cuanto a la asociación con hipertensión. En este gen se han identificado numerosos polimorfismos, si bien ninguno de ellos se localiza en la región

codificante. Las variantes mas estudiadas han sido cuatro denominadas en función de las enzimas de restricción que los cortan: *Taq I* y *Hind III* en la región 5', *Hind I* en la región 3', y *Bgl II* en el primer intrón (Morris y Ghriffiths, 1988; Naftilan y col., 1989; Corvol y col., 1997) (Figura 10). El polimorfismo *Bgl II* mostró variaciones significativas en estudios poblacionales en cuanto a las frecuencias alélicas y genotípicas, aunque no se pudieron encontrar diferencias significativas comparando hipertensos y normotensos en un estudio (Barley y col., 1991) y sí se hallaron en otro más reciente (Frossard y col., 1999).

Morris y col. (1988) estudiaron los polimorfismos de longitud de los fragmentos (RFLPs) obtenidos con la enzima de restricción *Hind III* en un grupo de hipertensos y en otro de normotensos, no encontrando ninguna diferencia en las frecuencias de distribución de los mismos en ambos grupos. Naftilan y col. (1989) analizaron cuatro polimorfismos del tipo anteriormente comentado, RFLPs, utilizando las enzimas *Taq I*, *Hind III*, *Bgl II* y *Bgl III*, no encontrando asociación. Posteriormente, otros estudios corroboraron esos resultados (Soubrier y col., 1990; Zee y col., 1991; Jeunemaitre y col., 1992b; Okura y col., 1992).

Barley y col. (1991) describieron diferencias étnicas importantes en la distribución de los polimorfismos del tipo RFLPs obtenidos con los enzimas *Bgl II*, *Bgl III* y *Taq I*. Además, encontraron asociación entre presión sanguínea elevada y el polimorfismo *Bgl II* en afrocaribeños. Estos resultados no fueron corroborados más tarde (Daniel y col., 1994).

También se ha descrito que una elevación en la actividad de la renina confería una predisposición a desarrollar complicaciones cardiovasculares (Alderman y col., 1991).

Se han podido constatar asociaciones positivas con HTA esencial, historia familiar de HTA y otras enfermedades cardiovasculares (Barley y col., 1991; Okura y col., 1993; Morise y col., 1994a; Dzida y col., 1996; Chiang y col., 1997a; Frossard y col., 1995, 1998, 1999).

Los polimorfismos del gen de la renina no están claramente implicados en la HTA, lo que no resulta sorprendente puesto que, aunque la renina inicia el proceso de conversión del AGT a angiotensina II, no es un factor limitante. El incremento de los niveles de AGT por sí sólo puede producir incremento de los

niveles de angiotensina II, sin ningún cambio en la actividad plasmática de la renina. Por lo tanto la renina no controla la producción de angiotensina II y debe tener muy poca influencia en la vasoconstricción en condiciones fisiológicas normales. Otro factor a considerar son los posibles efectos pleiotrópicos que pudieran producirse (Gerber y Crews, 1999). La mayor parte de las proteínas deben completar su función primaria con gran fidelidad y eficacia. Si una variante no lo hiciera, en un breve periodo de tiempo la evolución debería sustituirla por otras variantes más competentes y ese ADN sería "expulsado" del *pool* genético. Todas las variantes del gen de la renina realizan su función primaria de convertir el AGT en angiotensina II con la misma fidelidad y eficacia. Sin embargo, estas variantes pueden tener efectos pleiotrópicos asociados a sistemas no conocidos, que rindan mayor o menor beneficio para la supervivencia (Crews, 1999).

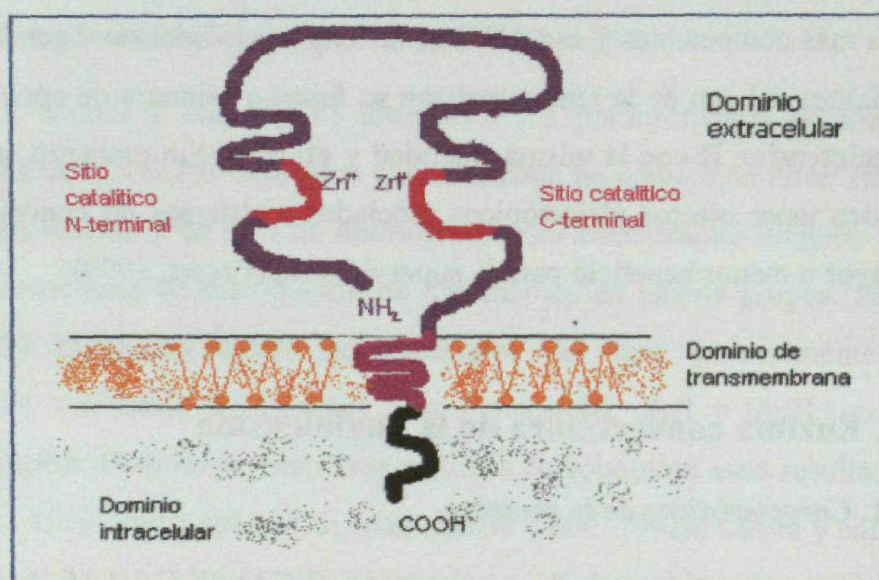
1.8.3. Enzima convertidora de la angiotensina

1.8.3.1. Características de la proteína

La enzima convertidora de la angiotensina (ECA) (E.C.3.4.15.1) es la segunda enzima clave del SRA. Es una proteína altamente conservada en todas las especies de mamíferos. Se presenta en dos formas, somática y testicular (Soubrier y col., 1993). La forma testicular o germinal sólo se encuentra en las células espermatogénicas posmeióticas y en los espermatozoides. La forma somática, ampliamente distribuida en el organismo, genera el octapéptido activo AII a partir del decapeptido AI e inactiva la bradicinina vasodilatadora. Esta doble acción como generadora de una sustancia vasopresora e inhibidora de un péptido vasodilatador e hipotensor refuerza su papel en el tono vascular, como pone de manifiesto la eficacia de los inhibidores de la ECA en el tratamiento de la hipertensión (Gerber y Crews, 1999). La ECA es una glicoproteína con actividad dipeptidil-carboxipeptidasa que hidroliza el dipéptido histidil-leucina de la AI fisiológicamente inactiva, convirtiéndola en el péptido activo AII. La forma somática es una proteína de 170 kDa, anclada a la membrana celular exponiendo dos dominios extracelulares homólogos, cada uno de los cuales contiene un sitio activo. Estos dos sitios catalíticos se unen cada uno de ellos a un ion zinc, fundamental para su actividad catalítica. La unión con la membrana se realiza

mediante un péptido hidrofóbico en el extremo C-terminal (Figura 11). Cuando se rompe el extremo C terminal el enzima es liberado al plasma. Esta forma del enzima se ha aislado en diferentes fluidos biológicos como el plasma, líquido cefalorraquídeo, líquido amniótico y líquido seminal (Wei y col., 1991).

Figura 13. Esquema de la localización de la ECA somática



La forma germinal es una proteína de 90 kDa que tiene únicamente un dominio extracelular y un sitio activo (Hubert y col. 1991; Cousterouse y col., 1992).

La actividad de la ECA está muy influenciada por determinados aniones; así el cloro permite una unión más favorable con ciertos sustratos y el zinc actúa en el paso hidrolítico de la catálisis. Aunque los dos dominios catalíticos de la enzima muestran grandes homologías en cuanto a su secuencia, parecen existir diferencias estructurales y de función. Los extremos carboxilo y amino muestran preferencias catalíticas dependiendo del sustrato, del sitio de excisión y de la concentración de cloro (Corvol y col., 1995).

Los glucocorticoides y las hormonas tiroideas inducen la ECA endotelial (o somática), mientras que los andrógenos estimulan la ECA germinal (Hubert y col., 1991).

La AII producida por acción de la ECA se destruye rápidamente por acción de varias peptidasas. Su vida media en humanos es de 1 a 2 minutos. Una aminopeptidasa suprime el residuo Asp de la porción N-terminal del péptido; el heptapéptido resultante tiene actividad fisiológica y se conoce como angiotensina III, (AIII). La aminopeptidasa puede actuar sobre la AI produciendo (des-Asp)-angiotensina I y este compuesto puede convertirse directamente en angiotensina III por acción de la ECA. No se considera a la reacción catalizada por la ECA como un paso limitante en la formación de AII ya que existen otras peptidasas capaces de convertir la AI en AII.

En el tratamiento de la enfermedad hipertensiva han sido muy importantes los descubrimientos en los inhibidores de la ECA (IECAS), como el "Captopril" y el "Enalapril" que impiden la conversión de AI en AII. La acción de los IECAS no sólo es debida a la inhibición de la síntesis de la AII, sino que parecen intervenir en la inhibición del sistema calicreina-quinina y sobre las prostaglandinas. Se han propuesto diferentes mecanismos para explicar cómo se produce el descenso de las resistencias vasculares periféricas debido a los IECAS (Swartz y col., 1979; Kostis, 1989; Salvetti, 1990); son los siguientes:

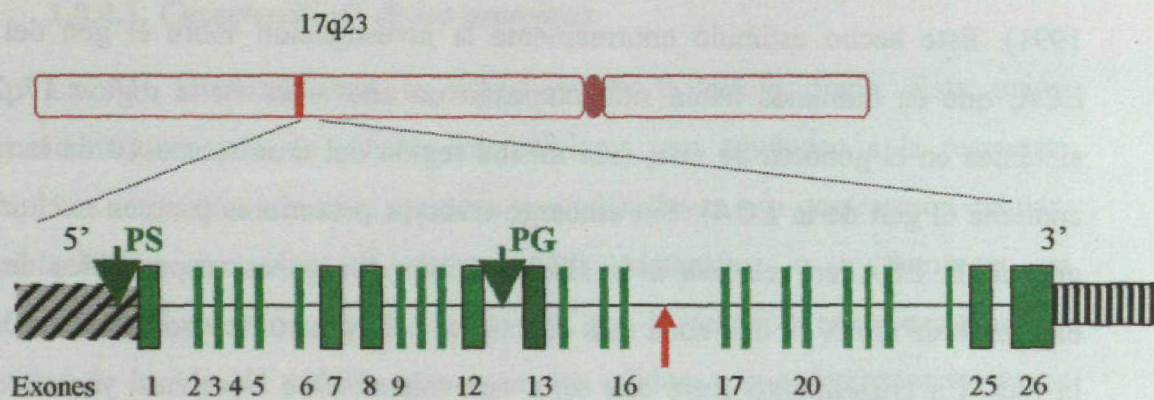
1. Disminución de la vasoconstricción mediada por la AII, tanto en el ámbito plasmático como tisular.
2. Bloqueo del sistema nervioso simpático, mediante la inhibición de la liberación de norepinefrina de las terminaciones presinápticas, o inhibición de la respuesta postsináptica presora a la AII o a la norepinefrina.
3. Inhibición del SRA cerebral en el ámbito reflejo del barorreceptor, lo que incrementa la capacidad de amortiguación de los barorreceptores.
4. Bloqueo de la producción de AII en el ámbito de la médula oblongata, lo que conduce a una reducción de la actividad simpática.
5. Acumulo de agentes vasodilatadores como la bradiquinina en la pared vascular por la inhibición de la quinasa II.
6. Estimulación de la biosíntesis de otros agentes vasodilatadores como la prostaglandina y el óxido nítrico, debido al incremento de bradiquinina tisular.

La ECA se localiza en los tejidos periféricos y en el endotelio pulmonar, lugares en los que se produce la mayor conversión de AI en AII (Shapiro y col., 1983). La distribución de la ECA somática es muy amplia, encontrándose en riñón, íleon, duodeno y útero. La ECA se expresa principalmente en células endoteliales epiteliales neuroepiteliales y en algunas células endocrinas. Se encuentra en la membrana plasmática de las células del endotelio vascular, principalmente del endotelio vascular pulmonar. También se expresa en el borde en cepillo del epitelio absortivo del intestino delgado. Por último se ha encontrado en el plexo coroideo cerebral, en los monocitos macrófagos y células T (Defendini y col., 1983).

La forma germinal de la ECA ha sido detectada en las vesículas intracelulares del espermatozoide. En el testículo se expresan las dos isoformas de la ECA, sin embargo no se sabe bien cual es su papel en estos tejidos. En el caso de la ECA renal se especula si además de su participación en la reabsorción del fluido del túbulo proximal, podría intervenir en la ruptura de los dipéptidos de las proteínas filtradas y reabsorbidas, que son posteriormente procesadas por las células epiteliales. En el caso del sistema nervioso central podría interferir con la secreción de vasopresina. En la glándula adrenal se piensa que tiene más importancia su papel en la liberación de catecolaminas que en la regulación de la síntesis de aldosterona (Defendini y col., 1983; Danilov, 1987).

1.8.3.2. Estructura del gen.

El gen de la ECA se encuentra en el brazo largo del cromosoma 17 (q23). Tiene una longitud aproximada de 21 Kb. Contiene 26 exones y codifica las dos formas de ECA, somática y germinal. Presenta dos promotores funcionales para la síntesis de las dos formas. El promotor somático se localiza en el extremo 5' del primer exón y el promotor germinal en el extremo 5' del exón 12. El ARN mensajero (ARNm) de la ECA somática comprende desde el exón 1 hasta el 26, a excepción del exón 13, y el ARNm de la ECA germinal incluye desde el exón 13 hasta el 26 (Hubert y col., 1991) (Figura 14).

Figura 14. Localización cromosómica y estructura del gen de la ECA

PS: promotor somático; PG: promotor germinal.

La flecha en rojo indica el lugar donde se produce la variante I/D (intrón 16).

Se ha encontrado gran semejanza intrafamiliar en los niveles plasmáticos de ECA, lo que sugiere que existe una variante del gen que es responsable de la variación de su concentración (Cambien y col., 1988). También se ha demostrado que existe una gran variabilidad en los niveles de ECA entre individuos normales, mientras que éstos en el mismo individuo permanecen constantes (Alhenc-Gelas y col., 1991).

Hace una década se halló un polimorfismo que consistía en la presencia o ausencia de un fragmento intrónico de 287 pb, una secuencia *Alu* (secuencias de ADN muy repetidas). Se localiza en el intrón 16 del gen. La presencia o ausencia de esta secuencia explica una variación entre el 30 y el 40 % en los niveles de la enzima. Los individuos homocigotos para el alelo "Delección" o "D", D/D, presentan los mayores niveles de enzima, les siguen los individuos heterocigotos, es decir los que presentaban un alelo D y un alelo "Inserción" o "I", D/I, y por último los individuos homocigotos para la inserción, I/I, son los que presentan menores niveles de enzima.

Han sido detectados otros polimorfismos del gen de la ECA (Villard y col., 1996), pero ninguno de ellos afecta a la expresión del gen.

1.8.3.3. Estudios de asociación

Estudios de mapeo genético realizados en rata pusieron de manifiesto la relación entre dos *loci* del brazo largo del cromosoma 10 y la HTA (Hilbert y col., 1991). Este hecho estimuló enormemente la investigación sobre el gen de la ECA, que en humanos había sido mapeado un año antes en la región 17q23, sinténica en el genoma de rata, (esa misma región del cromosoma 10 de la rata contiene el gen de la ECA). Sin embargo trabajos posteriores parecen excluir al gen de la ECA en relación a la HTA y situar los genes responsables de la elevación de la PA en una zona más cercana al centrómero del cromosoma 10 de la rata. Un cruzamiento entre una cepa espontáneamente hipertensa y una cepa normotensa que porta el gen de la ECA de la cepa hipertensa demostró que ni la tasa plasmática de ECA ni el gen de la ECA por sí mismo eran responsables de la variación de la PA entre las dos cepas (Kreutz y col., 1995).

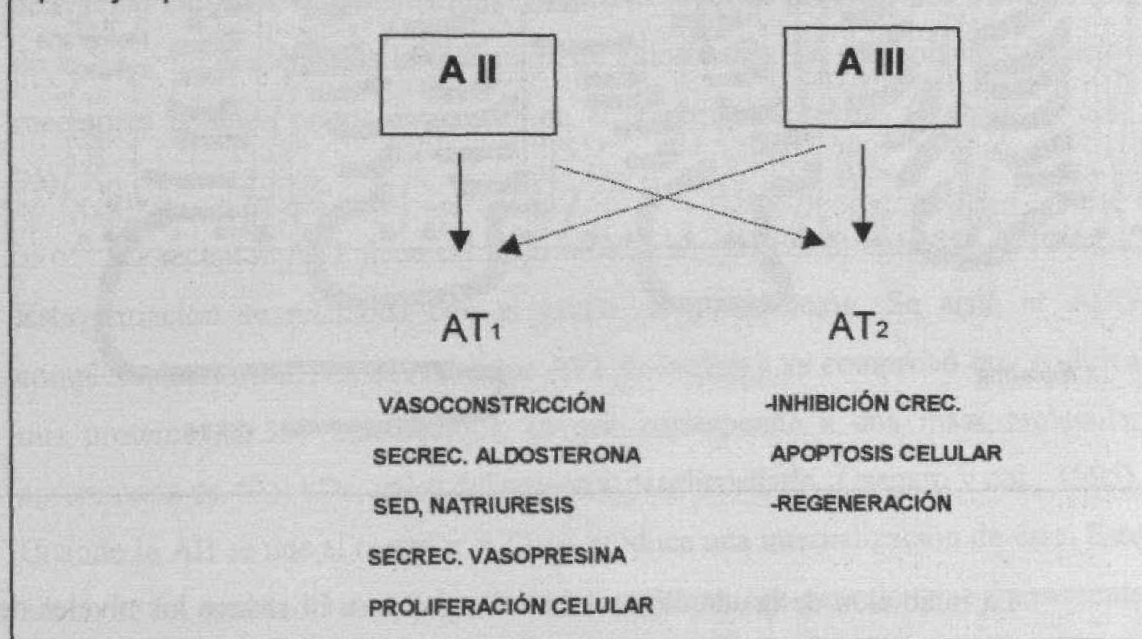
Debido a su asociación con la concentración plasmática del enzima, el polimorfismo I/D ha sido el más estudiado en patología cardiovascular en los últimos doce años (Rigat y col., 1990; Tiret y col., 1992; Cousterouse y col., 1993; Poch y col., 1997). Los estudios en humanos que han analizado la asociación del polimorfismo I/D y la HTA, han dado lugar a resultados dispares. Algunos de ellos han encontrado asociación entre el genotipo D/D e hipertensión únicamente en hombres (O'Donnell y col., 1998; Fornage y col., 98); otros han encontrado dicha asociación en hombres y mujeres (Higasmori y col., 1993; Duru y col., 1994; Barley y col., 1996; Barley y col., 1996; Mastana y Nunn, 1997; Higaki y col., 2000). Por el contrario, otros trabajos no han podido confirmar dicha asociación (Jeunemaitre y col., 1992c; Harrap y col., 1993; Gu y col., 1994; Kamdar y col., 1994; Morise y col., 1994c; Popov y col., 1996; Maguchi y col., 1996; Chiang y col. 1997b).

1.8.4. Receptores de la angiotensina II tipo 1 (AT1) y tipo 2 (AT2)

1.8.4.1. Características de las proteínas

La AII interactúa con la superficie de la célula diana. Esta unión desencadena una serie de señales intracelulares que conducen a la respuesta tisular. Las respuestas son muy variadas y pueden llevar a la contracción celular, estimulación o secreción de determinadas sustancias, o a favorecer su proliferación (Figura 15). Se ha observado que la relación entre estructura y actividad de la AI, AII y AIII varía según los tejidos, y que determinados iones muestran efectos diferentes con la unión de AII en distintos tejidos (Gasparo y col., 1995); esto llevó a concluir que existen varios tipos de receptores de AII.

Figura 15: Acciones biológicas mediadas por los receptores de angiotensina Tipo 1 y Tipo 2.



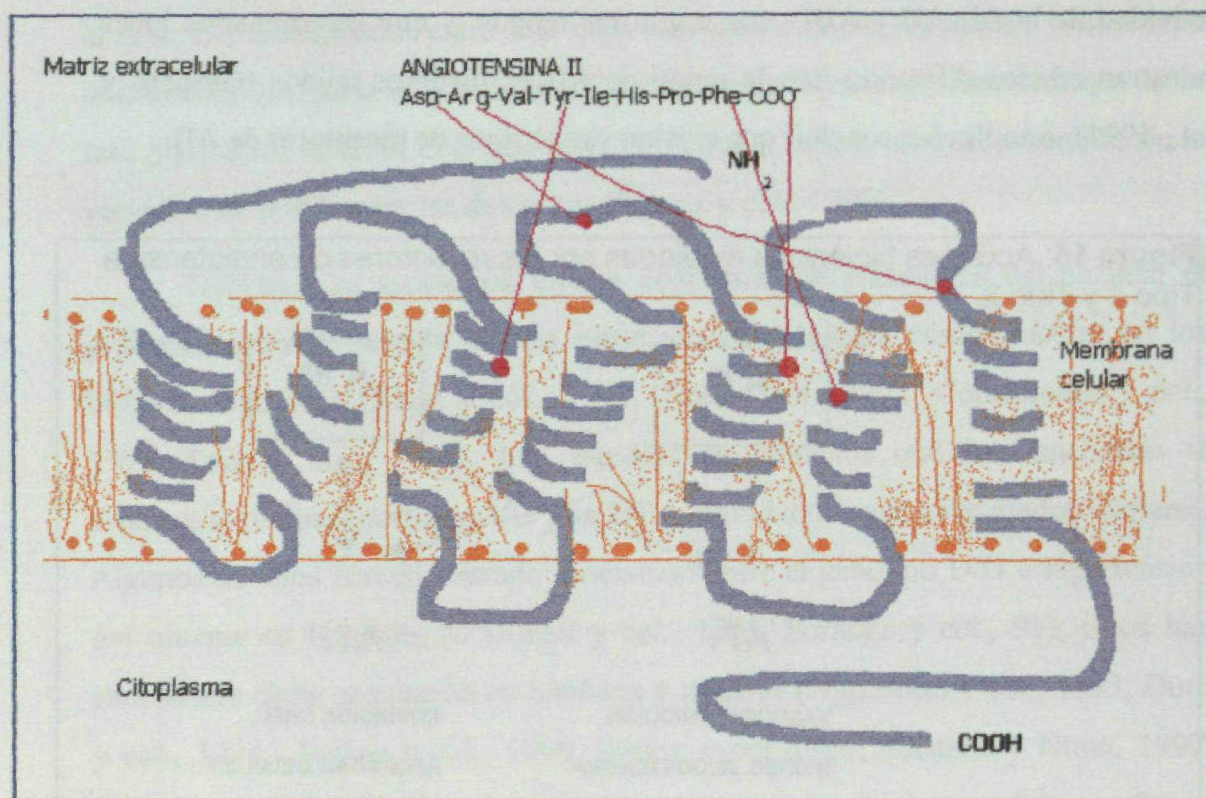
Se han podido caracterizar dos subtipos de receptores: AT1 y AT2, aunque se piensa que pueden existir otros.

1.8.4.2. Receptor AT1

Los receptores tipo 1 pertenecen a la superfamilia de los receptores con siete dominios transmembrana, acoplados a proteínas G y a los sistemas clásicos de segundos mensajeros.

En la Figura 16 se muestra mediante líneas rojas los aminoácidos de contacto entre el receptor y la AII.

Figura 16. Estructura transmembranal del receptor AT1.



La inhibición de la adenilato ciclasa vía proteína Gi reduce los niveles de AMP cíclico, mientras que son activadas varias fosfolipasas vía proteínas Gq ó Gp. La inducción de las fosfolipasas D y A2 provoca la producción de eicosanoides, mientras que la activación de la fosfolipasa C da como resultado la activación de la vía del fosfoinositol, provocando un incremento del calcio intracelular y la activación de la proteína kinasa C. Este hecho activa los factores inmediatos de transcripción, mediando al menos una parte de los efectos tróficos de la AII (Clauser y col.,1996; Stroth y Unger, 1999).

La AII juega un papel primordial en la osmorregulación central (Hoehle y col., 1995). La mayor parte de las áreas involucradas en la osmorregulación central expresan el receptor AT1, mientras que la expresión del receptor AT2 es limitada. La estimulación de los receptores AT1 en órganos periventriculares provoca una respuesta osmorreguladora que incluye la secreción de vasopresina a la circulación, sed, natriuresis y respuesta presora a dosis altas. La activación de los receptores AT1 vasculares provoca un aumento del calcio intracelular y consecuentemente vasoconstricción. Este mecanismo se bloquea en el tratamiento de la hipertensión por los inhibidores de la ECA y por los antagonistas del receptor AT1.

La expresión del receptor AT1 en el conjunto de tejidos implicados en la mayor parte de las funciones de la AII, así como los estudios farmacológicos extensivos, han mostrado que este receptor es responsable de casi la totalidad de las acciones vasculares y renales de la AII. Es bien conocido que si después de la activación del SRA se bloquean los receptores AT1, se produce una disminución de la PA y un descenso en la liberación de aldosterona. La estimulación de estos receptores también podría intervenir en el crecimiento celular (Gasparo y col., 95).

El receptor AT1 tiene un peso molecular que oscila entre 58 y 79 kDa. Esta variación se relaciona con el grado de glicosilación. Se aisló el ADN complementario (ADNc) del receptor AT1 de la rata y se comprobó que codifica una proteína de 359 aminoácidos, lo que corresponde a una masa molecular aproximada de 40,9 kDa, valor del receptor desglicosilado (Gasparo y col., 1995). Cuando la AII se une al receptor AT1 se produce una internalización de éste. Este hecho se ha estudiado en células de la musculatura lisa vascular que únicamente expresan receptores AT1. Al administrar AII radiactiva, el 65% de la misma se observa en el interior de la célula a los 6 minutos aproximadamente, posteriormente se produce una reinserción en la superficie de la membrana, proceso que viene a durar unos 15 minutos y que resulta fundamental para evitar la pérdida de receptores (Ullian y Linas, 1989).

En cuanto a su localización tisular, los receptores AT1 predominan en la mayoría de órganos y tejidos involucrados en el balance electrolítico y en la regulación de la PA. Se localizan en las glándulas adrenales, en la musculatura

lisa vascular, en el riñón y en el corazón. Se han encontrado receptores AT1 en algunas áreas del cerebro como el hipotálamo y en los núcleos supraópticos. Se conocen dos subtipos de receptores AT1: los AT1a y los AT1b, que se diferencian principalmente en su ubicación y en que el AT1a media la mayor parte de los efectos conocidos de la AII.

1.8.4.3. Receptor AT2

El papel de los receptores AT2 y sus características de unión, sus mensajeros y distribución no se conocen con exactitud. Al igual que los AT1, son receptores con siete dominios transmembranales, pero la vía de señalización es bastante desconocida. El receptor AT2 posee un 30 % de homología con el AT1. Se sabe que las acciones del receptor ATR no están mediadas por la proteína G. Mediante el cultivo de células neuronales se ha probado que la AII estimula la producción de GMPc a través de su unión con el receptor AT2 (Summers y col., 1991). Existen evidencias que indican que en el receptor AT2 del cerebro se localiza principalmente en las zonas relacionadas con el control y el aprendizaje de la actividad motora y en las áreas sensorial, visual y del sistema límbico, pero no en los centros relacionados con la sed, apetito de sal, control de la PA y liberación de vasopresina. También se localiza en la médula suprarrenal, en el ovario y en el útero, y se le ha relacionado con el crecimiento y desarrollo debido a su abundante presencia en el feto (Grady y col., 1991). El receptor AT2 se encuentra asimismo en el epitelio vascular y se sobreexpresa en ciertas circunstancias patológicas como la insuficiencia cardíaca y el post-infarto (Unger y col., 1996).

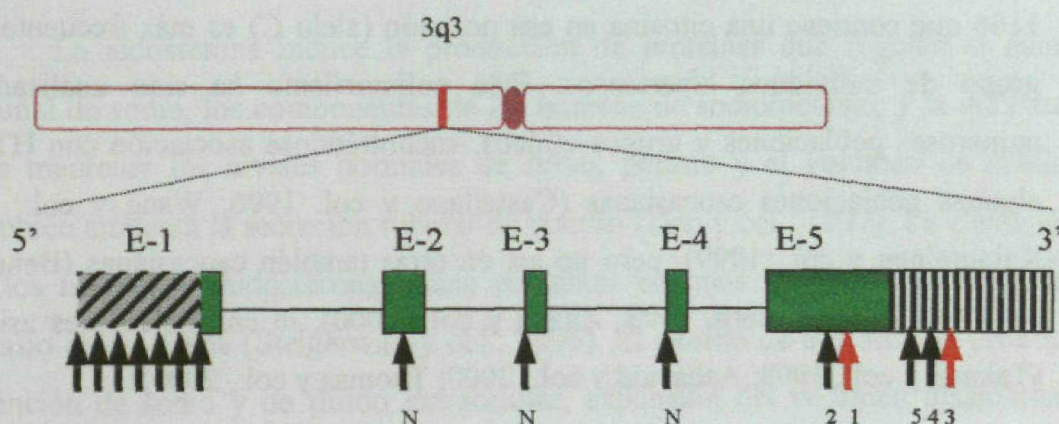
La afinidad de la unión del receptor AT2 es distinta para cada uno de los miembros de la familia de péptidos de la angiotensina, siendo mayor para la AIII seguida por la AII y por último la AI.

1.8.4.4. Estructura del gen del receptor AT1

El gen del receptor AT1 se encuentra en el brazo largo del cromosoma 3 (3q3) (Murphy y col., 1991; Takayanagi y col., 1992). Los primeros análisis de estructura del gen indicaron que solamente presentaba un exón (Curnow, y col.,

1992; Bonnardeaux y col., 1994), junto a la presencia de dos regiones alternativas 5' no traducidas (UTRs: *untranslated regions*). Estas UTRs contienen una secuencia inicial común pero difieren en la presencia o ausencia de una inserción de 84 pares de bases. Posteriores análisis parecen indicar que el gen se compone de cinco exones, aunque el exón 5 es el único que se traduce, conteniendo la secuencia del receptor. Los otros 4 exones acompañan al exón 5 de forma alternativa en el ARNm, no siendo traducidos. Tan solo cuando el exón 5 es acompañado del exón 3, la proteína contiene 32 aminoácidos más. En el caso de que el exón 5 vaya acompañado de otros exones, existen diferencias en cuanto a la eficacia de la traducción del receptor (Curnow, 1996) (Figura 17).

Figura 17. Localización cromosómica y estructura del gen del receptor AT1



E: exones. N: número indeterminado de mutaciones. El exón 5 es el único que se traduce siempre y contiene la secuencia del receptor.

Las flechas indican los lugares de mutaciones conocidas y en rojo las analizadas en este trabajo. Los números indican las mutaciones que aparecen en la Figura 18.

1.8.4.5. Estudios de asociación

Una vez caracterizado el gen, se inició la búsqueda de polimorfismos que pudieran asociarse a un incremento de la PA. El análisis de la secuencia codificante y de la región 3' no traducida del gen del receptor AT1, en un grupo de individuos con HTA familiar y otro de normotensos, reveló dos polimorfismos en la región codificante y tres en la región 3' no traducida del gen (Bonnardeaux y col, 1994) (Figura 18).

Figura 18. Polimorfismos del gen del receptor AT1.

VARIANTE	REGIÓN	POSICIÓN	SUSTITUCIÓN	FRECUENCIA
1	codificante	573	T→C	0,56
2	codificante	1062	A→G	0,03
3	3' no traducida	1166	A→C	0,36
4	3' no traducida	1517	G→T	1 individuo*
5	3' no traducida	1878	A→G	0,13

* Mutación

Ninguno de los polimorfismos hallados alteraba la secuencia de aminoácidos codificada por el gen. Solamente se encontró asociación con hipertensión en la variante 1166 de la región 3' no traducida, en la que ocurre una transversión (A/C). La mutación se produce en el extremo 5' de la región 3' no traducida. Se ha comprobado que el cambio no afecta a la poliadenilación ni a la estabilidad del ARNm (Bonnardeaux y col., 1994). La variante del polimorfismo 1166 que contiene una citosina en esa posición (alelo C) es más frecuente en el grupo de individuos hipertensos. Este polimorfismo ha sido analizado en numerosas poblaciones y grupos étnicos, encontrándose asociación con HTA en algunas poblaciones caucásicas (Castellano y col. 1996, Wang y col., 1997; Kainulainen y col., 1999), pero no así en otras también caucásicas (Benetos y col. 1995, Berge y Berg, 1998; Zhang y col., 2000), ni en poblaciones asiáticas (Takami y col., 1998; Ashavaid y col., 2000; Thomas y col., 2000).

También ha podido constatarse asociación de este polimorfismo con HTA en la gestación (Morgan y col., 1997), hipertrofia ventricular izquierda (Takami y col., 1998), y estrechamiento aórtico (Benetos y col., 1995).

Son interesantes los recientes estudios sobre la eficacia de respuesta de los fármacos que bloquean los receptores AT1, según el genotipo del paciente. Así se ha demostrado que los pacientes con el alelo *1166C* responden mejor a determinados bloqueantes de estos receptores (Miller y col., 1999).

El polimorfismo *C573T*, en el exón 5 del gen, no ha mostrado asociación con PA (Bonnardeaux y col., 1994; Poirier y col., 1998). Sin embargo si se ha encontrado asociado a microalbuminuria (Chaves y col., 2001).

También se estudiaron polimorfismos en los cuatro exones no traducidos y en la región 5' adyacente del gen, en la que se detectaron siete variantes: -1424, -

810, -713, -521, -214, -213, y -153 (aguas arriba desde el comienzo de la transcripción), no encontrándose ninguno de ellos relacionado con la HTA (Poirer y col., 1998).

1.8.5. Aldosterona

La aldosterona es un potente modulador de la PA. Se trata de una hormona mineralcorticoide que se produce en la zona glomerulosa del córtex adrenal. La aldosterona es el principal producto de secreción de la glándula adrenal, su función más importante es regular el balance de sodio, como consecuencia de ello el volumen de fluido extracelular, y por tanto la PA (Don y col., 1997).

La producción de aldosterona está controlada en un principio por el SRA y por los niveles de sodio y potasio en plasma.

La aldosterona induce la producción de proteínas que regulan el canal luminal de sodio, los componentes de las bombas de sodio/potasio, y la ATPasa, para mantener los niveles normales de sodio, potasio y el volumen de fluido. También aumenta la secreción tubular de potasio (Don y col., 1997). La elevación de los niveles de aldosterona puede aumentar en unas horas la excreción de potasio en un 270% (Steigerwalt y col., 1995). El exceso de aldosterona provoca retención de sodio y de fluido extracelular, expansión del volumen plasmático, incremento del gasto cardiaco, vasoconstricción, incremento de la PA, hipocalcemia e hipertensión (Don y col., 1997).

Varias formas de HTA pueden atribuirse directamente a defectos en la síntesis de aldosterona (síndromes descritos anteriormente como formas monogénicas de HTA). Dada su importancia, las variantes moleculares de las enzimas que sintetizan aldosterona desde la progesterona, o los receptores celulares de la aldosterona, podrían tener influencia en la variaciones de la PA. Sin embargo hasta ahora son muy escasos los trabajos realizados en este campo y muchos mecanismos moleculares son aún desconocidos (Crews y Williams, 1999).

1.9. ÓXIDO NÍTRICO SINTASA

El gen de la óxido nítrico sintasa (ONS), gen *Nos* (*nitric oxide synthase*), representa un candidato adicional al SRA para examinar sus efectos moleculares en la presión sanguínea y la HTA. El óxido nítrico (ON) se ha encontrado en células endoteliales. Es una molécula con un enorme poder vasoactivo. Es el principal vasodilatador fisiológico en humanos, sin embargo no parece ser crítico en la patogénesis de la HTA. Aparentemente la HTA reduce la producción de ON, siendo por lo tanto una secuela de la HTA más que una causa (Yanagisawa y col., 1988; Brown, 1997). El ON se describió originalmente como un factor relajante derivado del endotelio, a causa de su acción dilatadora. El ON inhibe la adhesión y agregación plaquetaria, la proliferación de las células del músculo liso y es un componente constitutivo de del sistema cardiovascular. La falta o la retirada de ON se asocia a HTA, daño orgánico, disminuye la diuresis, la natriuresis y el flujo renal en modelos animales (Nava y Lusher, 1995).

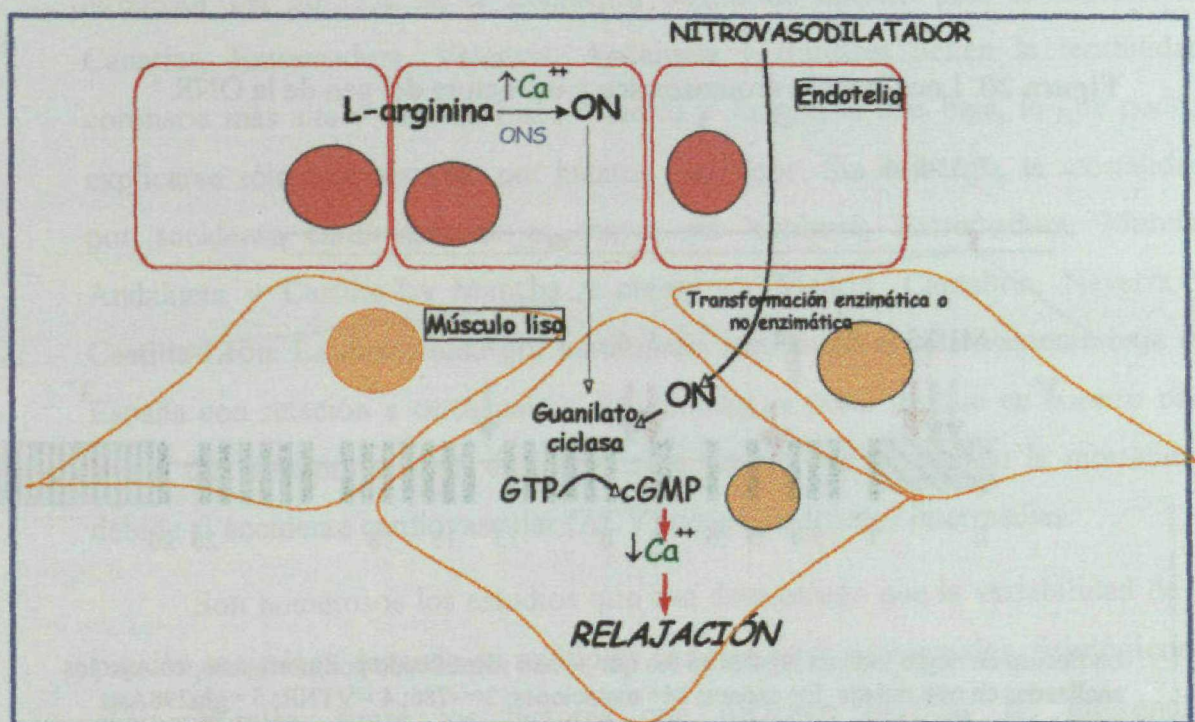
Existe una variante de la ONS que produce niveles patológicamente altos de ON. La ONS parece activarse o regularse por factores fisiológicos, como la elevación de la PA, acetilcolina, bradiquinina y calcio intracelular (Ignarro, 1996). Cardillo y col. (1998) han sugerido que la disfunción endotelial en la HTA esencial es debida a anormalidades selectivas en la ONS. El estudio del gen de la ONS humana ha permitido la identificación de varias mutaciones, aunque en ninguna de ellas se ha encontrado una asociación concluyente con la PA (Brown, 1997).

1.9.1. *Mecanismo de acción de la óxido nítrico sintasa*

Hay tres formas conocidas de ON sintasas, y de ellas, la variante que se expresa en células endoteliales podría jugar el papel principal en la regulación de la PA. Esta forma de enzima es activada por elevaciones del calcio intracelular. El efecto del ON en el músculo liso parece estar mediado por una forma soluble de guanidilciclase que contiene un grupo hemo. El GMP cíclico, cuya producción es ampliamente estimulada por el ON, se ha demostrado que causa relajación del

músculo liso. De este modo la ruta se regula de forma simple: el ON se une a su receptor de guanidilciclase, produciendo la elevación de GMP cíclico, el cual a su vez produce activación de G quinasas (Garbers y Dubois, 1999) (Figura 19).

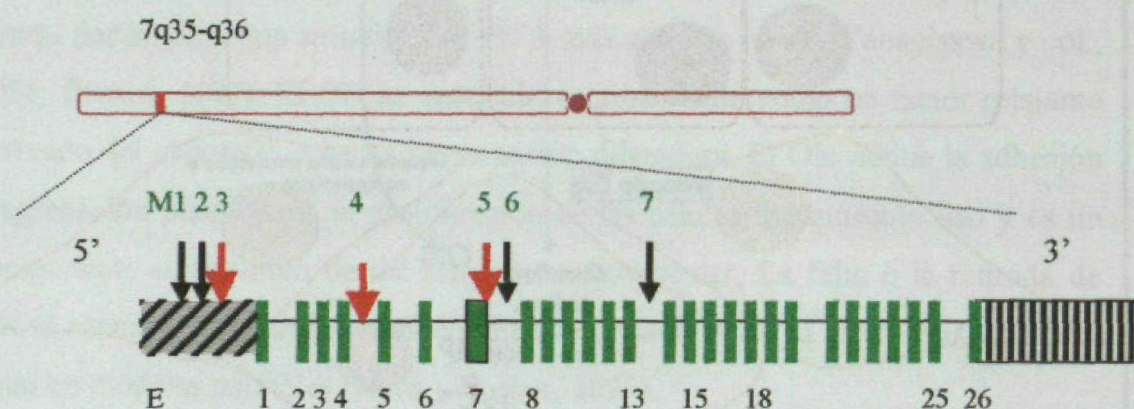
Figura 19. Relajación del músculo liso vascular inducida por el ON.



1.9.2. Gen *Nos*

El gen *Nos* se encuentra en el cromosoma 7 en la región 7q35-q36. Su tamaño es de 21 Kb y contiene 26 exones (Nadaud y col.,1994). Se han descrito polimorfismos tanto en la región del promotor como en exones e intrones (Benjafield y Morris, 2000) (Figura 20).

Figura 20. Localización cromosómica y estructura del gen de la ONS.



La flechas en negro indican lugares en los que se han identificado polimorfismos, en rojo los analizados en este trabajo. E= exones; M= mutaciones: 3= -786; 4=VNTR; 5=glu298Asp.

A continuación se describen únicamente los polimorfismos que se han escogido para su análisis en este trabajo, por su asociación en otras poblaciones con la PA (Benjafield y Morris, 2000).

Polimorfismo VNTR: Se encuentra en el intrón 4 del gen *Nos*. Consiste en un número variable de repeticiones en tandem (VNTR, *Variable Number of Tandem Repeats*), que constan de 27 pb.

Polimorfismo Glu298Asp. Este polimorfismo se encuentra en el exón 7 del gen *Nos*. Es una mutación que consiste en el cambio de una guanina por una timina en la posición 894. Origina la sustitución del aminoácido glutámico por una asparragina en la posición 298 de la cadena polipeptídica.

Polimorfismo -786 T→C: Se localiza en el promotor del gen *Nos*. Esta mutación de la región 5' flanqueante consiste en el cambio de una timina por una citosina en la posición -786.

2. JUSTIFICACIÓN

En España, en la década de los 90, las enfermedades del aparato circulatorio causaron hasta el 40% de todos los fallecimientos. Se calcula que alrededor del 30-35% de la población adulta de nuestro país es hipertensa. Canarias, Extremadura, Valencia, Andalucía y Baleares tienen la mortalidad coronaria más alta y Castilla-León, Madrid y Aragón la más baja, lo que podría explicarse sólo parcialmente por hábitos dietéticos. Sin embargo, la mortalidad por accidente cardiovascular es mayor en Valencia, Extremadura, Murcia, Andalucía y Castilla-La Mancha y menor en Madrid, Cantabria, Navarra y Castilla-León. La mortalidad por cardiopatía isquémica es relativamente baja en España con relación a otros países occidentales, a pesar de que en nuestro país existe una alta prevalencia de factores de riesgo. Por otra parte la mortalidad debida al accidente cardiovascular (ACV) ocupa posiciones intermedias.

Son numerosos los estudios que han demostrado que la variabilidad de la presión sanguínea depende de múltiples factores medioambientales, fisiológicos y socioculturales. Entre los factores que permiten explicar las diferencias poblacionales en la PA se encuentran la dieta, ingesta de sodio, estrés, los factores ecológicos y culturales y una predisposición asociada con la etnia y la biología. La identificación de estas variables no ha sido suficiente para obtener un modelo que explique las variaciones de la PA de un modo definitivo.

La PA está regulada o influenciada por genes e interacciones entre distintos genes, interacciones gen-medioambiente, factores medioambientales y otros relacionados con el comportamiento. Estos factores pueden ser individuales, familiares, poblacionales o de la propia especie. Los estudios en gemelos, de adopción y familiares han mostrado que existe un componente heredable de la PA y la HTA, estimado en un valor que oscila entre el 15 y el 35% mientras que al menos el 50% es debido a factores exclusivamente ambientales. El componente genético depende de múltiples genes, por ello es interesante su identificación y el análisis de su contribución a la variación del fenotipo PA, ya que es lógico pensar

que es lógico pensar que los genes que tienen influencia en la PA deberían contribuir al desarrollo de la HTA esencial.

Por su implicación en la regulación de la PA, los genes que codifican componentes del sistema renina-angiotensina son candidatos para estudiar cómo afectan a la PA. En la mayoría de las poblaciones estudiadas se ha encontrado una asociación positiva entre la PA y alguno de los polimorfismos de los genes que componen el SRA, pero hay que destacar las discrepancias en los resultados obtenidos por distintos grupos de investigación. Ello podría deberse a las diferencias en el diseño de los trabajos, y también a la existencia de diferencias en el fondo genético de las distintas poblaciones estudiadas. Por ello es necesario analizar en diferentes poblaciones la asociación entre distintos factores genéticos y la PA.

En España son escasas las investigaciones relacionadas con la distribución de los polimorfismos genéticos del SRA y su implicación en las variaciones de la PA. Cuando se inició el estudio sobre epidemiología de la HTA (1992), que ha servido de base a esta tesis, no se había publicado en nuestro país ningún trabajo sobre este tema. Por ello el Dr. Angel Puras Tellaeche (D.E.P.), a su vuelta de la Universidad Loyola en Chicago donde trabajó con el grupo del Dr. Richard Cooper en el Departamento de Medicina Preventiva y Epidemiología, comenzó una línea de investigación sobre epidemiología genética de la HTA que complementaba otros estudios epidemiológicos ya iniciados sobre esta enfermedad.

El trabajo que aquí se presenta se ha realizado sobre una población general, formada por 1.300 individuos, elegidos de forma aleatoria y estratificada según la distribución por quintiles extremos de PA, y no según criterios clínicos de hipertensión. Se ha analizado la contribución a la variación del fenotipo PA tanto de factores ambientales como de polimorfismos de los genes del SRA y del gen de la ONS.

3. OBJETIVOS

El presente estudio ha tenido como objetivo general investigar si, en la población de Albacete, existen variantes polimórficas en los genes del sistema renina-angiotensina y en el gen de la óxido nítrico sintasa que influyeran de forma diferencial la presión arterial, en interacción con factores ambientales. De ser así se buscaría asignar un valor predictivo a estas variantes en el desarrollo de una PA elevada. Para ello se han analizado de forma comparada grupos extremos de PA a través de un estudio epidemiológico poblacional.

Los objetivos concretos del trabajo fueron:

1. Determinar las frecuencias de los siguientes polimorfismos de genes del sistema renina-angiotensina en la población de Albacete, estudiar su asociación con la PA, y compararlas con otras poblaciones análogas:

- Gen *Agt*: *T174M*, *M235T*.
- Gen de la ECA: *Inserción/Delección*.
- Gen del receptor AT1: *A1166C*, *C573T*.

2. Analizar la relación genotipo (*I/D*) y fenotipo (actividad enzimática) del gen de la ECA, dada la importancia de la enzima en el control y tratamiento de la PA.

3. Analizar la asociación de los antecedentes familiares de HTA y del IMC con la PA y con los polimorfismos de los genes del AGT, ECA y receptor AT1.

4. Analizar la existencia de otros factores de riesgo como son glucosa, colesterol, HDL-colesterol y triglicéridos, y su relación con la PA.

5. Establecer la asociación del desarrollo de HTA con la concentración sérica de óxido nítrico y con los siguientes polimorfismos del gen de la renina y del gen de la ONS:

- Gen *Ren*: *BglII*.
- Gen *Nos*: *Glu298Asp*, *VTNR*, *-786 T→C*.

3. OBJETIVOS

El presente estudio tiene como objetivo principal determinar la asociación entre los polimorfismos de los genes de los sistemas de renina-angiotensina y la presión arterial en una población de sujetos sanos. Se evaluarán los niveles de actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y los niveles de angiotensina II en suero y en orina, así como la presencia de los polimorfismos de los genes de los sistemas de renina-angiotensina en el ADN de los sujetos. Se utilizará un protocolo de estudio prospectivo y controlado, con mediciones de la presión arterial y de los niveles de ECA y angiotensina II en suero y en orina, y análisis de los datos genéticos.

3.1. OBJETIVO GENERAL

El objetivo general del presente estudio es determinar la asociación entre los polimorfismos de los genes de los sistemas de renina-angiotensina y la presión arterial en una población de sujetos sanos.

3.2. OBJETIVOS ESPECÍFICOS

Los objetivos específicos del presente estudio son:

1. Determinar los niveles de actividad de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) en suero y en orina.
2. Determinar los niveles de angiotensina II en suero y en orina.
3. Determinar la presencia de los polimorfismos de los genes de los sistemas de renina-angiotensina en el ADN de los sujetos.
4. Determinar la asociación entre los polimorfismos de los genes de los sistemas de renina-angiotensina y la presión arterial.

3.3. METODOLOGÍA

El presente estudio es un estudio prospectivo y controlado, con mediciones de la presión arterial y de los niveles de ECA y angiotensina II en suero y en orina, y análisis de los datos genéticos. Se utilizará un protocolo de estudio prospectivo y controlado, con mediciones de la presión arterial y de los niveles de ECA y angiotensina II en suero y en orina, y análisis de los datos genéticos.

El estudio se realizará en una población de sujetos sanos, con mediciones de la presión arterial y de los niveles de ECA y angiotensina II en suero y en orina, y análisis de los datos genéticos.

• Genes de los sistemas de renina-angiotensina

• Genes de los sistemas de renina-angiotensina

4. MATERIAL Y MÉTODOS

4.1. POBLACIÓN DE ESTUDIO

La población analizada en este trabajo se ha basado en un estudio epidemiológico poblacional previo realizado en la provincia de Albacete (población general). Se trata de un estudio de asociación con diseño *casos-control*. Dicho estudio poblacional, llevado a cabo por el Grupo de Enfermedades Vasculares de Albacete (GEVA), ha sido objeto de otras cuatro tesis doctorales (Artigao, 1998; Divisón, 1998; Sanchis, 1998; Carrión, 2001) presentadas en el departamento de Medicina de la Universidad Autónoma de Madrid, bajo la dirección del Dr. D. Angel Puras Tellaeche y del Profesor Dr. D. Manuel de Oya Otero.

Según el censo de 1991, el número de habitantes mayores de 18 años era de 218.462 en esta provincia. Las características sociodemográficas de estos habitantes eran similares. El estudio se realizó sobre la prevalencia de los factores de riesgo cardiovascular en una población urbana y rural de Albacete, de este modo se obtuvo una muestra aleatoria de 1.322 personas (Artigao, 1998). El tamaño de la muestra se calculó tomando como base un estudio previo de supervivencia, en el cual el factor de riesgo con la menor prevalencia esperada fue el de la enfermedad arterial periférica (1,4%) (Artigao, 1998). Para obtener un intervalo de confianza de 0,9% a 1,9%, con respecto a la prevalencia esperada de la enfermedad arterial periférica, se requería un total de 2.121 participantes. La muestra final ha constado de 1.322 personas, como consecuencia de la disminución en el número de individuos derivado del hecho de que es población general y no pacientes (en estudios de población general son más frecuentes las pérdidas en el número de individuos que en estudios realizados con grupos más concretos, como podrían ser enfermos). La pérdida en el número de individuos no afecta a la significación estadística, ya que se cuenta con un número suficiente de individuos. El muestreo aleatorio, estratificado y bietápico, se examinó en dos fases, con un tamaño de las muestras proporcional al tamaño de la población

local: el 40% de los participantes era de la capital, el 23,1% de pueblos con más de 10.000 habitantes, y el 36,9% de pueblos y aldeas de menos de 10.000 habitantes. Durante la primera fase del estudio los participantes fueron seleccionados al azar en 22 zonas de población, mientras que en la segunda fase, los participantes fueron seleccionados por muestreo sistemático al azar siendo después contactados. La información básica se recogió mediante cuestionarios previamente diseñados (Artigao, 1998; Puras y col., 1998). En estos cuestionarios se incluye la historia familiar y personal de enfermedades cardiovasculares. Se definió historia familiar si el padre, madre o hermanos del encuestado eran hipertensos. Se incluyó una investigación sobre factores de riesgo como el tabaco, estrés, vida sedentaria, nivel cultural y nivel económico entre otros (Anexo 3; cuestionario completo).

Después de completar el cuestionario se tomaron el peso, altura y la PA, según las recomendaciones de la Sociedad Británica de Hipertensión, como se detallará más adelante. Así se seleccionaron, ajustando por edad y sexo, y por niveles de PA una submuestra de 612 sujetos, que constituían el primer y el quinto quintil de PA, de los que finalmente acudieron a la cita para su inclusión en el estudio 412 individuos.

La Tabla 3 refleja la distribución de los 1.322 participantes por grupos de edad y sexo con los percentiles 20 (primer quintil), 50 (mediana) y 80 (quinto quintil) de PAS.

Tabla 3. Distribución de los participantes por edad y sexo con los percentiles 20 (1^{er} quintil), 50 (mediana) y 80 (5^o quintil) de la presión arterial sistólica.

Grupos Edad	HOMBRES				MUJERES			
	N	P20	P50	P80	N	P20	P50	P80
25-34	183	110,0	125,2	139,0	215	101,0	112,4	122,5
35-44	93	109,0	124,1	137,5	94	107,0	118,5	132,5
45-54	86	114,0	131,4	150,0	111	115,0	135,9	155,0
>54	246	124,0	143,0	163,0	289	128,0	150,4	171,0

N = número de participantes. P = percentil.

Finalmente, como se ha comentado, fueron 412 individuos los que constituyeron el primer y quinto quintiles de distribución de la PA (grupos de menor y mayor PA, respectivamente). A continuación se expone la tabla con las PA medias y las medias de edad de los dos quintiles estudiados.

Tabla 4. Medias de edad, PAS, PAD y % de hombres de los 412 individuos seleccionados en los dos quintiles.

	Edad (DE)	% ♂	PAS (DE) mm Hg	PAD (DE) mmHg
1^{er} quintil Nº=198 (48,1 %)	50,4 (17,8)	44,7	116,99 (16,26)	72,03 (10,88)
5º quintil Nº=214 (51,9 %)	51,6 (17,9)	47,9	138,44 (21,71)	79,81 (12,92)

PAS: presión arterial sistólica. PAD: PA diastólica. Nº: número de individuos
DE: desviación estándar.

4.2. GRUPO HIPERTENSOS-NORMOTENSOS

Como un trabajo independiente del estudio de población general referido en el apartado anterior, se llevó a cabo un estudio de casos-control: *Hipertensos-Normotensos*, con un grupo de 36 pacientes de la consulta de Nefrología del Hospital General de Albacete, diagnosticados como hipertensos severos. Con este grupo y 39 individuos pertenecientes al 5º quintil del estudio de población general que presentaban PA elevadas (todos ellos hipertensos), se constituyó un grupo de *casos*, y un grupo del primer quintil de 48 individuos de PA normal, que constituyó el grupo *controles*. En estos grupos se compararon las frecuencias de los polimorfismos de los genes *Ren* y *Nos*, así como el análisis de los niveles séricos de ON en ambos.

En la Tabla 5 se muestran las características de estos dos grupos.

Tabla 5. Medias de edad, PAS, PAD y % de hombres de los grupos analizados.

	Edad (DE)	% ♂	PAS (DE) mmHg	PAD (DE) mmHg
NORMOTENSOS Nº= 48	54,37 (15,32)	55	120,61 (21,61)	74,22 (9,14)
HIPERTENSOS Nº= 75	60,36 (10,60)	36	161,91 (21,55)	(85,39) (13,15)

PAS: presión arterial sistólica. PAD: PA diastólica. Nº: número de individuos
DE: desviación estándar.

En este estudio se analizó el polimorfismo *BgII* del gen de la renina junto a tres polimorfismos más en el gen de la ONS: VTNR, Glu298Asp y -786, y se determinaron los niveles de óxido nítrico en suero.

4.3. TRABAJO DE CAMPO

Se dispuso de un despacho específico en el Hospital General de Albacete, vinculado al Servicio de Medicina Interna, en el que se realizaron los cuestionarios, las mediciones, extracción de sangre, y donde se encontraba el soporte informático para todo el estudio.

Los participantes residentes fuera de la capital fueron vistos en sus Centros de Salud por los diferentes miembros del equipo investigador (GEVA), que previamente habían pasado las certificaciones correspondientes para la toma de la PA y de las medidas antropométricas.

4.4. FASES DEL ESTUDIO

4.4.1. Citaciones

A cada participante se le enviaron dos cartas de citación, en la primera se les invitaba a participar en el estudio (Anexo 1), al tiempo que se les informaba en que consistía este. Más adelante se les envió la segunda carta (Anexo 2), para recordar las condiciones en las que debían acudir a la cita. El día previo a la cita se había preparado el cuestionario y los tubos para la extracción de la sangre con su número de identificación y debidamente etiquetados.

En los Centros de Salud de la provincia se informó personalmente al coordinador médico de cada centro de los objetivos y de la metodología del estudio, con el fin de solicitar su colaboración y la del personal de enfermería para la extracción de sangre.

Se puso al corriente al personal administrativo de cada centro para que los participantes que lo solicitasen pudieran obtener información sobre el estudio.

4.4.2. Etiquetado

A cada paciente se le asignó un número de identificación de 10 dígitos: el primer número indica la pertenencia al 1^{er} quintil (1) o al 5^o quintil (2); los

siguientes tres números corresponden a los números correlativos del estudio, los seis últimos números corresponden a la fecha de nacimiento de cada participante (día/mes/año). Este número de 10 dígitos, que se asignó en la primera visita, es el número utilizado para la base de datos, en todos los análisis de laboratorio y ha sido el número de referencia de cada participante.

4.4.3. Consentimiento informado

A todos los individuos del estudio se les ha preguntado su aceptación para completar los cuestionarios, toma de tensión, realización de las medidas antropométricas y extracción de muestras de sangre y orina. La participación fue voluntaria y cada participante fue requerido para complementar y firmar un formulario de consentimiento antes de continuar con cualquier procedimiento.

4.4.4. Confidencialidad

La confidencialidad se ha garantizado mediante el uso de los códigos de identificación. Las copias impresas se han guardado en archivadores cerrados y los documentos de ordenador se han protegido mediante contraseñas. Las publicaciones derivadas del estudio sólo harán referencia a datos de grupo.

Todos los investigadores que han participado en el presente trabajo se comprometen a que cada sujeto sea tratado según las normas éticas aplicables a la investigación en humanos, establecidas en la Declaración de Helsinki (Junio 1964), y sus actualizaciones de Tokio (Octubre 1975), Venecia (Octubre 1983) y Hong Kong (Septiembre 1989). Previamente a su presentación el estudio ha sido revisado y aceptado por las Comisiones de Investigación y Comité Ético de Investigaciones Clínicas del Hospital General de Albacete.

4.4.5. Medición de las variables clínicas

4.4.5.1. Medición de la PA

Las mediciones de la PA se llevaron a cabo bajo criterios de estandarización con esfigmomanómetros de mercurio. Se hicieron tres

determinaciones de la PA en posición sentada. En el momento previo a la medida la persona debería haber vaciado su vejiga y estaría sentada, en un ambiente tranquilo, durante 5 minutos. Lógicamente el manguito habría de ser el apropiado al tamaño de su brazo.

En primer lugar se determinó la frecuencia cardiaca en 30 segundos y a continuación se realizó la primera medición de la PA. Se hicieron tres mediciones sucesivas, con determinaciones alternativas de la frecuencia cardiaca.

Los esfigmomanómetros se revisaron cada tres meses. Se realizaron certificaciones periódicas de la toma de la PA, también cada tres meses, a las personas que efectuaban estas mediciones, a lo largo del periodo de estudio. Para ello se usaron lecturas periódicas con estetoscopios de doble cabezal y se realizaron vídeo-tests.

4.4.5.2. Medidas antropométricas

El peso se determinó con básculas previamente calibradas. La altura se midió con una cinta situada en la pared con la persona puesta en pie y de espaldas a la pared. Las diferentes circunferencias (cintura, cadera) se realizaron con cintas métricas. Se determinaron los siguientes índices:

- Índice de masa corporal (IMC): peso en Kg/talla en m².
- Ratio cintura-cadera: circunferencia de cintura/circunferencia de cadera.

4.4.6. Recogida de muestras biológicas

Las muestras de sangre venosa se obtuvieron realizando la extracción entre las 8 y las 10 horas de la mañana, después de un periodo de 10 a 12 horas de ayuno.

Se recogieron tres tubos de 5 ml que contenían como anticoagulante EDTA K3, para la obtención de plasma y concentrado de leucocitos destinado este último a la obtención de ADN. Se extrajeron otros tres tubos de 5 ml sin ningún aditivo para la obtención de suero. Los tubos y el material empleado para la extracción eran de la marca Vacutainer (Plymouth, Reino Unido).

Los tubos con el anticoagulante se mezclaron y se guardaron a 4°C, hasta la extracción del concentrado de leucocitos. Ésta se realizó centrifugando la sangre a 2.500 r.p.m. durante 20 minutos a 4°C. Una vez centrifugado y mediante pipetas estériles de un solo uso se separó en primer lugar el plasma y a continuación el concentrado de leucocitos de las células rojas, a partir del cual se extraería el ADN. El concentrado de leucocitos se colocó en crioviales y se almacenó a -70°C hasta proceder a la extracción de ADN contando con un número de muestras determinado.

Con los tubos que no contenían aditivo se procedió de la siguiente forma: se centrifugó el tubo a 2.000 r.p.m. a 4°C durante 10 minutos, para posteriormente separar el suero de la fracción celular y almacenarlo a -70°C. Con este suero se realizarían las pruebas bioquímicas generales y la determinación de la actividad de la ECA y de la concentración del óxido nítrico.

4.5. BIOQUIMICA GENERAL

Se analizó la concentración en suero de los siguientes parámetros bioquímicos: Glucosa, Colesterol, HDL-Colesterol y Triglicéridos.

El análisis de estos parámetros se realizó en el Laboratorio de Análisis Clínicos del Hospital General de Albacete, Sección de Bioquímica, entre las muestras de la rutina diaria de la programación del laboratorio. Los controles de calidad son los que el laboratorio programa diariamente para su control interno y externo.

4.6. DETERMINACION DE ACTIVIDAD DE LA ECA

La determinación de la actividad de este enzima ECA en suero se realizó mediante una reacción colorimétrica empleando un Kit denominado *Angiotensin Converting Enzyme* (Sigma Diagnostics, St. Louis, MI, EE.UU.). El método está basado en la siguiente reacción:

ECA

FAPG= N-[3-(2-furil)acrilol]-L-fenilalanilglicina; FAP= furilacrilolifenilalanina.

La hidrólisis del FAPGG produce una disminución en la absorbancia a 340 nm., proporcional a la actividad de la enzima. La absorbancia a esta longitud de onda fue medida en un autoanalizador Hitachi modelo 704 (Hitachi, Tokio, Japón). La actividad de la ECA en la muestra se determinó por comparación de la tasa de reacción con la de un calibrador. La medición se realizó en suero ya que el EDTA inhibe la actividad del enzima. Se descartaron para su análisis los pacientes que estaban en tratamiento con antihipertensivos e inhibidores de la ECA.

4.7. DETERMINACIÓN DEL ÓXIDO NÍTRICO

Se realizó con la colaboración del Dr. D. Eduardo Nava, del área de Fisiología de la Facultad de Medicina de la Universidad de Castilla-La Mancha (Campus de Albacete). Se determinó por electroforesis capilar según la técnica previamente descrita (Nava y col., 1996). Alícuotas de 5 a 10 μl de suero ultrafiltrado fueron diluidas 10 veces en agua ultrapura y analizadas en un equipo Quanta Capillary Ion Analyser system (Waters, Mildford, EE.UU.). Se usaron capilares de sílice de 75 μm de diámetro interno y 100 cm de longitud (Composite Metal Services, Hallow, Worcestershire, Reino Unido). El electrolito consistió en una solución de sulfato de sodio (10 mM) que contenía modificador de flujo osmótico al 5% (CIA-Pak Anion-BT, Waters) en agua destilada. Las muestras se inyectaron por electromigración durante 120 sg a -1KV y se analizaron aplicando un potencial de 30 KV con polaridad negativa. Se registró absorbancia a 214 nm con una tasa de muestreo de 20 puntos/segundo. Los datos fueron analizados con el programa Millennium 2010 Chromatography Manager (Waters). El límite de detección del nitrato plasmático se estimó que estaba entre 0,1-0,2 μM . El nitrato plasmático se cuantificó en las muestras tomando como referencia una curva estándar de NaNO_3 , diluido en plasmas. Estas muestras de plasma se procesaron del mismo modo que las muestras problema.

4.8. ANÁLISIS DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS

La puesta a punto de la mayor parte de las técnicas de biología molecular descritas a continuación, se realizó en la Sección de Biotecnología del Instituto de Desarrollo Regional (IDR) de la Universidad de Castilla La Mancha, dirigida por el Profesor Dr. D. José Antonio Fernández Pérez. Los análisis de las muestras se llevaron a cabo en el Laboratorio de Biología Molecular de la Unidad de Investigación del Hospital General de Albacete, coordinada por el Dr. D. Damián García Olmo.

4.8.1. Extracción de ADN genómico humano

Se partió del concentrado de leucocitos obtenido como se comentó anteriormente. Se realizó la extracción del ADN mediante el método clásico de extracción con disolventes orgánicos y digestión enzimática con proteinasa K (Kunkel y col., 1982) o alternativamente con un Kit comercial de extracción rápida de ADN (Kristal Genomic Mini KG, Cambridge Molecular Technologies Limited, Cambridge, Reino Unido). Finalmente el ADN purificado se disolvió en tampón TE (Tris-HCL 10 mM pH 8.0; EDTA 1mM pH 8.0) o en agua.

4.8.2. Cuantificación del ADN obtenido

La cuantificación del ADN obtenido se realizó mediante espectrofotometría, midiendo la absorbancia a 260 nm. La pureza de las muestras de ADN se determinó mediante la relación de absorbancias 260/280, considerándose que un valor entorno a 2 indicaba que la muestra era suficientemente pura y un valor inferior a 1,5 como insuficientemente pura.

4.8.3. Análisis de los polimorfismos del gen del angiotensinógeno

Para realizar el análisis de los polimorfismos *T174M* y *M235T* se amplificó mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), un fragmento de 338 pb del exón 2.

Para la reacción de amplificación se utilizaron las condiciones y los cebadores descritos por Rutledge y col. (1994). La secuencia de estos cebadores es la siguiente: cebador A (sentido) 5'-GATGCGCACAAAGGTCCTGTC-3'; cebador B (antisentido): 5'CGCCCGCCCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCCGCTGCTGTCCACACTGGCTCGC-3'. El cebador B contenía un añadido de 40 pb GC, con el fin de asegurar la visualización de los fragmentos después de la digestión con enzimas de restricción.

Condiciones de la PCR: mezcla de reacción por muestra: en un volumen total de 70 µl: 40 pmol de cada cebador; 125 µmol/L de cada nucleótido; 50 mmol/L KCl; 10 mmol/L tris HCL (pH 8,3); 1.5 mmol MgCl₂; 0,1 % Triton X-100 10% (v/v); H₂O: variable; 2.5 U/µL de Taq polimerasa (Perkin-Elmer, Foster City, EE.UU.); 200-400 ng de ADN de la muestra.

Las reacciones de PCR se llevaron a cabo en un termociclador modelo 2400 de Perkin-Elmer con el siguiente programa:

94°C (desnaturalización inicial), 5 min	
94°C (desnaturalización), 30 seg.	} 35 ciclos
64°C (hibridación), 30 seg.	
72°C (síntesis), 2 min.	
72°C (síntesis final), 10 min.	

El producto de la reacción de amplificación fue analizado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2 %, con bromuro de etidio, realizada en tampón TBE 0,5X (Tris-borato 45 mM; EDTA 1 mM). El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

La detección de los polimorfismos *T174M* y *M235T* se realizó mediante digestión con enzimas de restricción.

Condiciones de la incubación con las enzimas de restricción:

Partiendo de una alícuota del producto de PCR, con el fragmento de 338 pb amplificado se prepararon los tampones de digestión con el siguiente protocolo:

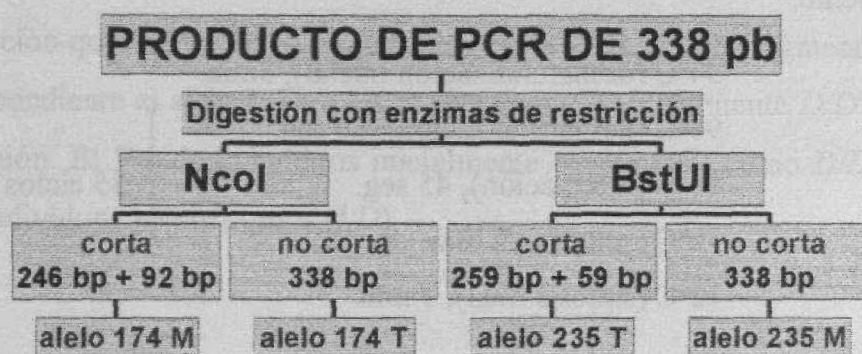
Mezcla de reacción para la enzima *NcoI*: en un volumen de 12 µl, 6 µl de H₂O autoclavada, 4 µl de tampón de digestión 10X NEB-4, 2 µl de enzima *NcoI* (New England Biolabs, Beverly, EE.UU.). Las muestras se incubaron a 37°C durante 2 horas de 12 µl de la mezcla de reacción y 28 µl de producto de PCR.

Mezcla de reacción para la enzima *BstUI*: en un volumen de 12 µl, 6 µl de H₂O autoclavada, 4 µl de tampón de digestión 10X NEB-2, 2 µl de enzima *BstUI* (New England Biolabs). Se incubaron a 12 µl de mezcla de reacción y 28 µl de producto de PCR a 60°C durante 2 horas.

Existe un lugar natural de restricción para la enzima *NcoI* en el fragmento amplificado en la posición +521 del exón 2 y que corresponde al polimorfismo *T174M* (alude a la posición del aminoácido en la cadena polipeptídica). El alelo *174M* contiene una diana de restricción para la enzima *NcoI*, mientras que el alelo *T174* carece de ella. Por tanto la digestión del fragmento de 338 pb con *NcoI* identifica al alelo *174M* y la no digestión al *T174*.

Para la detección del polimorfismo *M235T* se utilizó la enzima *BstUI*. Para ello hubo de introducirse un sitio de restricción *BstUI* mediante el cebador B, localizado en la posición +704 del exón 2. En el caso de que exista una timina la enzima no digiere el fragmento de 338 pb; en este caso en la cadena polipeptídica hay una metionina en posición 235 (alelo *M235*). Si por el contrario en la posición +704 del exón 2 hay una citosina, se crea ese sitio de restricción específico para la enzima *BstUI* y el fragmento es digerido en dos secuencias de 279 y 59 pb (alelo *235T*). En la cadena polipeptídica aparece una treonina en posición 235 (Figura 21).

La visualización de los fragmentos digeridos de ADN se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa al 1,5% y tinción con bromuro de etidio.

Figura 21. Esquema de la detección de los polimorfismos del gen *Agt*.

4.8.4. Análisis del polimorfismo I/D del gen de la ECA

Los polimorfismos analizados se han detectado en el intrón 16 del gen estructural de la ECA. Este intrón se presenta en dos formas diferentes, según contenga o no un fragmento de 278 pb. Si contiene dicho fragmento se trata del alelo *I* (inserción); si carece de dicho fragmento, del alelo *D* (delección).

Los cebadores empleados para amplificar la región I/D mediante PCR, son los diseñados por Lindpainter y col. (1995). Cebador Haca 3s (sentido): 5'-GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3'; Cebador Haca 3as (antisentido): 5'-GGATGGCTCTCCCCGCCTTGTCTC-3'. La amplificación con estos cebadores genera fragmentos de 319 pb ó 597 pb, según se trate del alelo *D* ó del *I*, respectivamente.

Condiciones de la PCR: mezcla de reacción: en un volumen total de 25 µl; 0,5 µM de cada cebador; 2 mM de nucleótidos; Cl_2Mg 1,3 µM, KCl 50 mM; Tris HCl 10 mM pH 8,4; Triton X-100 0.1%; H_2O variable; 0.5 U de Taq polimerasa (Perkin-Elmer); 100 µg de ADN genómico.

Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador con el programa siguiente:

94°C (desnaturalización inicial), 5min.	} 35 ciclos
94°C (desnaturalización), 30 seg.	
56°C (hibridación), 45 seg.	
72°C (síntesis), 2 min.	
72°C (síntesis final), 7 min.	

Los resultados obtenidos en cada amplificación fueron analizados mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio, realizada en tampón TBE 0,5X. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta. Los alelos *D* presentan un tamaño de 319 pb y los alelos *I* de 597 pb (Figura 22).

Figura 22. Esquema de la detección del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA.



Debido a las características de estos polimorfismos, el alelo *D* (de menor tamaño) se amplifica con preferencia en las muestras heterocigotas (individuos *I/D*), de modo que se presentan como *D/D* falsos. A estos últimos se les realizó una segunda amplificación con cebadores específicos del alelo *I*, de este modo se podía aclarar si se trataba de un *I/D* y no de un falso *D/D*.

Los cebadores diseñados para este último fin, reconocen una secuencia específica de la inserción, y son los siguientes: cebador DI-1 (sentido): 5'-TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3'; cebador DI-2 (antisentido): 5'-

TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3'. Esta amplificación se llevo a cabo en condiciones idénticas a las anteriormente descritas, exceptuando la temperatura de hibridación que fue de 70°C. El resultado de la PCR era un fragmento de 335 pb correspondiente al alelo *I*. Para las muestras que eran realmente *D/D* no había amplificación. El 5% de individuos inicialmente clasificados como *D/D* eran en realidad individuos heterocigotos (*I/D*).

4.8.5. Análisis de los polimorfismos del gen del receptor tipo 1 de la angiotensina II

Se estudian dos polimorfismos del gen del receptor tipo 1 de la AII (AT1).

Polimorfismo *A1166C*.

El primero de ellos es el polimorfismo *A1166C*, que se localiza en la región 3' no traducida del gen. Consiste en el cambio de una citosina por una adenina en esa posición. La determinación de los genotipos se realizó creando un sitio de restricción con el cebador "antisentido" que contiene dos bases discordantes con la secuencia del gen, esto genera una diana de restricción específica para la enzima *BfrI*. En el caso de que el nucleótido 1166 sea una citosina en lugar de una adenina, *BfrI* digiere la secuencia amplificada de 166 pb en dos fragmentos de 139 y 27 pb (alelo *C*). Si en esa posición hay un nucleótido de adenina no se produce digestión (alelo *A*). Los cebadores diseñados por Wang y col. (1997), son los siguientes: cebador AT1R-U (sentido): 5'-ATAATGTAAGCTCATCCACCAAGAAG-3'; cebador AT1R-D (antisentido): 5'-TCTCCTTACATTCTGAAAAGTACTTAA-3'.

Condiciones de amplificación: mezcla de reacción: en un volumen total de 7,99 µl; 0,025 µM de cada cebador; 2,5 mM de nucleótidos; 1,5 mM Cl₂Mg; 50 mM KCl; 10 mM Tris HCl pH 9; 0,1% Triton X-100 10% (v/v); H₂O variable; 1 unidad de Taq polimerasa (Perkin-Elmer); 100 ng de ADN genómico.

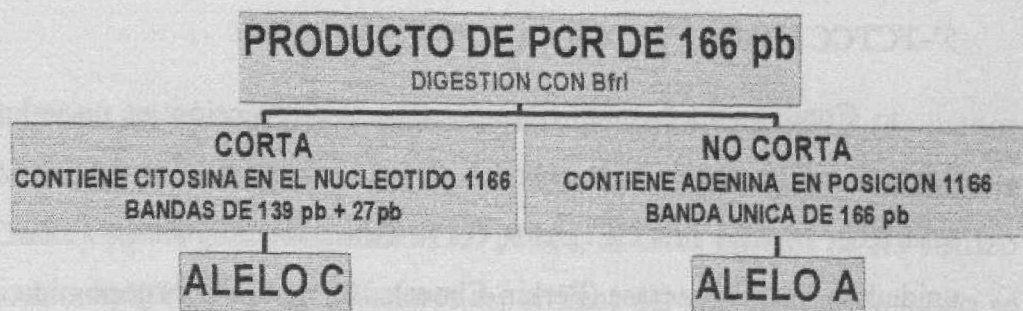
Las reacciones se llevaron a cabo en el termociclador con el programa siguiente:

94°C (desnaturalización inicial), 3 min.	
94°C (desnaturalización), 60 seg.	} 33 ciclos
50°C (hibridación), 60 seg.	
72°C (síntesis), 60 seg.	
72°C (síntesis final), 10 min.	

El resultado de la PCR fue comprobado mediante electroforesis horizontal en gel de agarosa al 2%, con bromuro de etidio, realizada en tampón TBE 0,5X. El ADN fue visualizado en un transiluminador de luz ultravioleta.

Condiciones de la incubación con la enzima de restricción: mezcla de reacción para la enzima *Bfr* I. En un volumen de 10 µl: 7,5 µl de H₂O autoclavada, 2 µl de tampón de digestión 10X, 0,5 µl de enzima *Bfr* I (Boheringer-Mannheim Gmb, Alemania). Se incubaron 10 µl de mezcla de reacción y 10 µl de producto de PCR de cada muestra, a 37°C durante 5 horas. El resultado de la incubación se visualiza como se ha descrito anteriormente en gel de agarosa, pero en este caso al 3% (más concentrado) y con una velocidad superior de electroforesis para evitar que las bandas difundan, ya que solo se diferencian en unos pocos pares de bases (Figura 23).

Figura 23. Esquema de la detección del polimorfismo A1166C del gen del receptor AT1.



Polimorfismo C573T

El estudio de este polimorfismo se llevó a cabo gracias a la colaboración del grupo de investigación formado por los doctores Chaves, Marín, Armengod y Redón del Instituto de Investigaciones Citológicas y del Hospital Clínico de la Universidad de Valencia.

El polimorfismo se encuentra en el exón 5 del gen del AT1R. La mutación consiste en el cambio de un nucleótido de timina por uno de citosina en la posición 573 de dicho exón. Este cambio no afecta al sentido del codón 191 que codifica una leucina (CTC→CTT). Los cebadores utilizados, descritos por Chaves y col. (2001), tienen la secuencia que se indica a continuación: cebador A (sentido): 5'-AATGCTTGTAGCCAAAGTCACCTG-3'; cebador B (antisentido): 5'-GGCTTTGCTTTGTCTTGTTG-3'.

Condiciones de amplificación: en un volumen total de 50 µl: 5 µM de cada cebador; 2,5 mM nucleótidos; 1.5 mM Cl₂Mg; 0.1% Triton X-100; 75 mmol/L Tris-HCl (pH 9,0); 36 µl H₂O; 1 U de Taq polimerasa; 10 ng de ADN genómico. Se reparte la mezcla en alícuotas de 5 µl y se añade el ADN (aprox. 10 ngr/µl) en cada muestra. Se añade aceite a cada tubo de reacción, aunque el termociclador posee placa calefactora superior, para evitar la evaporación en cantidades tan pequeñas. Programa del termociclador:

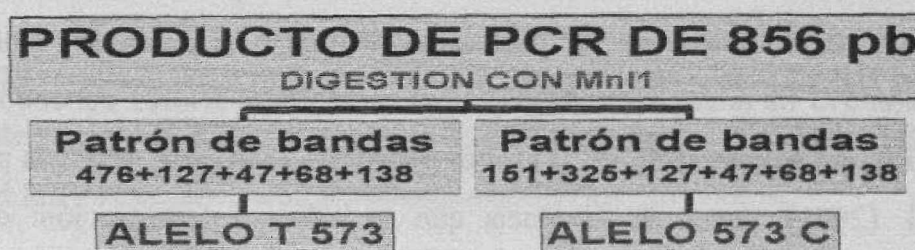
94°C (desnaturalización inicial), 3 min.	
94°C (desnaturalización), 30 seg.	} 33 ciclos
60°C (hibridación), 30 seg.	
72°C (síntesis), 45 seg.	
72°C (síntesis final), 5 min.	

Se amplifica un fragmento de 856 pb que se digiere con la enzima *MnII*, en las siguientes condiciones: En un volumen total de 2 µl: 1,24 µl H₂O; 0,7 µl Tampón de digestión (10x); 0,06 µl *MnII* (Fermentas). Se incubaron 2 µl de mezcla de reacción y 5 µl de producto de PCR, a 37°C durante 16 horas.

Como resultado se obtuvo un patrón de bandas de ADN diferente según se tratase del alelo *T* ó del alelo *C*. Si se trata del alelo *T*, se obtienen cinco bandas de

los siguientes tamaños: 476 pb, 127pb, 47pb, 68pb y 138 pb. Si el alelo es el C, se obtienen seis bandas de los siguientes tamaños, 151pb, 325pb, 127pb, 47pb, 68pb y 138 pb (Figura 24).

Figura 24. Esquema de la detección del polimorfismo *C573T* del gen del receptor AT1.



La visualización se realizó en geles de acrilamida, más adecuados que los geles de agarosa para fragmentos pequeños de ADN: gel de acrilamida al 10% en cristales de 10x10 cm: 6,5 ml H₂O; 1 ml TBE 10x; 2,5 ml acrilamida.

Para visualizar el ADN se empleó un protocolo de tinción con plata que básicamente consiste en lo siguiente: se fija mediante un lavado de 10 min. con etanol al 10% impidiéndose la difusión del ADN dentro de la matriz del gel. Posteriormente se procede a la oxidación con ácido nítrico (1,54% v/v), lo que favorece la unión con el ion plata a las bases nitrogenadas del ADN. La impregnación se lleva a cabo mediante un lavado con nitrito de plata (0,2% p/v) durante 20 min. Por último se revela el gel con una solución de carbonato sódico anhidro (2,96 % p/v) y formaldehído (0,054 % v/v). Se provoca así un cambio brusco del pH y la formación de sales de plata insolubles que precipitan sobre los cationes de plata unidos previamente a las bases nitrogenadas. Una vez obtenida la tinción adecuada, se detiene la reacción con un lavado breve con ácido acético (10% v/v). Por último se lava con agua.

4.8.6. Análisis del polimorfismo *Bgl*II del gen de la renina

La puesta a punto de la técnica se realizó en colaboración con el Dr. Francisco Sánchez del Área de Genética de la Facultad de Medicina de Albacete.

Se analiza el polimorfismo *Bgl*II en el intrón 1 del gen de la renina. El polimorfismo consiste en la existencia (+) o ausencia (-) de un sitio de restricción para la enzima *Bgl*II, en una región intrónica de 4,8 Kb. Los datos de las secuencias flanqueantes de esta región, que se encuentran en los exones 1 y 2, han sido descritos por Hardman y col. (1984). El estudio de este polimorfismo se basó en la técnica descrita por Frossard y col. (1999), en la que se describen los cebadores flanqueantes de la región no secuenciada: cebador R1 (sentido): 5'-GTGTCATTTCAGTCCTTACGAT-3'; cebador R2 (antisentido): 5'-AGTACAACCACCTTTAACGTT-3'.

Condiciones de amplificación: mezcla de reacción: en un volumen total de 25 µl; 20 pmol de cada cebador, 2 mM de cada nucleótido; 75 mM Tris-HCL pH 9; 20 mM (NH₄)SO₄; 2mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 0,5 U de Taq polimerasa; 16 µl H₂O; 100 ng de ADN genómico.

Programa del Termociclador:

94°C (desnaturalización inicial), 4 min.

94°C (desnaturalización), 30 seg.

62°C (hibridación), 60 seg.

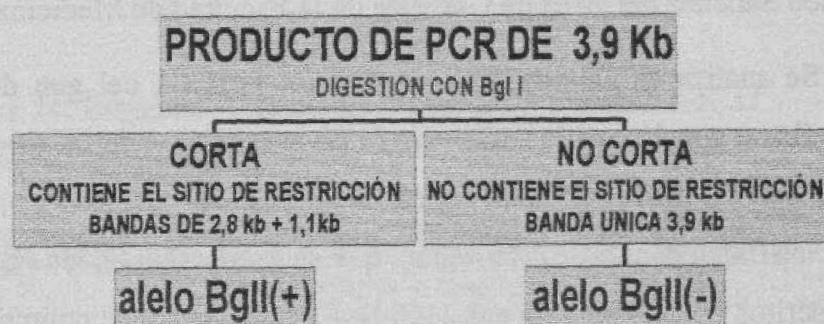
72°C (síntesis), 5 min.

72°C (síntesis final), 5 min.

33 ciclos

El fragmento amplificado se digirió con la enzima de restricción *Bgl* I, con la siguiente mezcla de reacción: en un volumen de 10 µl: 8 µl H₂O, 2 µl tampón de digestión, 1µl (0,5 U) de enzima *Bgl* I (New England Biolabs). Se incubaron 10 µl producto de PCR con 10 µl de mezcla de reacción a 37°C durante toda la noche. El producto de la digestión se visualizó en un gel de agarosa al 1% teñido con bromuro de etidio. En ausencia del sitio de restricción se detecta una banda de 3,9 Kb (alelo *Bgl*II (-)). Si existe tal sitio de restricción aparecen dos fragmentos de 2,8 y 1,1 Kb (alelo *Bgl* I (+)) (Figura 25).

Figura 25. Esquema de la detección del polimorfismo *Bgl* I del gen de la renina



4.8.7. Análisis de los polimorfismos del gen de la óxido nítrico sintasa

La puesta a punto también se realizó en colaboración con el Dr. Francisco Sánchez. Se analizan los polimorfismos *VNTR*, *Glu298Asp* y -786 , localizados en diferentes regiones del gen *Nos*.

Polimorfismo *VNTR*

Se encuentra en el intrón 4 del gen *Nos*. Este polimorfismo consiste en un número variable de repeticiones en *tandem* (que constan de 27 pb). El polimorfismo se detectó con los cebadores descritos por Benjafield y Morris. (2000). A continuación se describe la secuencia de los mismos y las condiciones de amplificación: cebador 1 (sentido): 5'- AGGCCCTATGGTAGTGCCTTT-3'; cebador 2 (antisentido): 5'-TCTCTTAGTGCTGTCGTCAC-3'.

Condiciones de la PCR: mezcla de reacción: en 20 μ l; 13,5 pM de cada cebador; 3 mM/L de cada nucleótido; 63 mM/L KCl; 13mM/L Tris-HCl, pH 8,3; 2 mM $MgCl_2$; 0.5 U Taq polimerasa; 100 ng ADN.

Programa del termociclador:

94°C desnaturalización inicial, 5 min.	
94°C (desnaturalización), 60 seg.	} 35 ciclos
56°C (hibridación), 60 seg.	
72°C (síntesis), 2 min.	
72°C (síntesis final), 5 min.	

El producto de la PCR es un fragmento de 393 pb para el alelo *a*, ó de 420 pb para el alelo *b*, que contiene una repetición más que el alelo *a* (27pb) Se visualizó en un gel de agarosa al 3% teñido con bromuro de etidio (Figura 26)

Figura 26. Esquema de la detección del polimorfismo *VTNR* del gen de la ONS



Polimorfismo *Glu298Asp*

Se encuentra en el exón 7 del gen *Nos*. Esta mutación consiste en el cambio de un nucleótido de guanina por uno de timina en la posición 894, que origina la sustitución del ácido glutámico por una asparragina en la posición 298 de la cadena polipeptídica. La detección de esta mutación se realizó siguiendo el protocolo de Benjafield y Morris (2000). Consiste en una amplificación seguida de una digestión con una enzima de restricción. Los cebadores empleados fueron los siguientes: cebador 1 (sentido): 5'- TCCCTGAGGAGGGCATGAGGCT-3'; cebador 2 (antisentido): 5'-TGA GGGTCACACAGGTTTCCT-3'.

Condiciones de la PCR: mezcla de reacción: en un volumen total de 25 μ l; 20 pmol de cada cebador 2,5 mM de cada nucleótido; 75 mM Tris-HCL pH 9; 20 mM (NH₄)SO₄; 2mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 0,5 U de Taq polimerasa; 16 μ l H₂O; 100 ng de ADN.

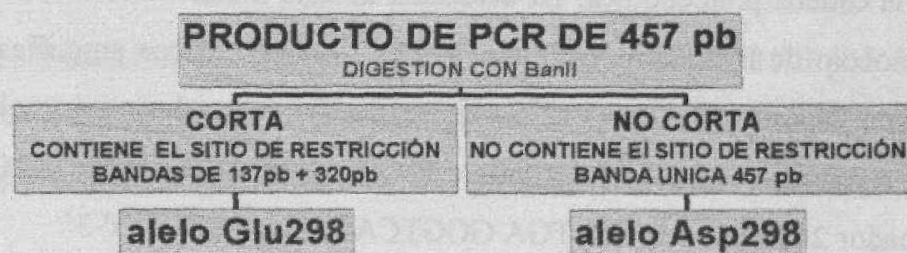
Programa del termociclador:

94°C. (desnaturalización inicial), 5 min.	
94°C (desnaturalización), 30 seg.	} 35 ciclos
59°C (hibridación), 300 seg.	
72°C (síntesis), 30 seg.	
72°C (síntesis final), 5 min.	

El fragmento amplificado de 457 pb se digiere con la enzima de restricción *BanII*. La mezcla de reacción para la esta enzima es la siguiente: En un volumen de 10 μ l; 7 μ l de H₂O autoclavada, 2 μ l tampón de digestión y 1 μ l (0,5 U) de enzima *BanII* (Promega, Madison, EE.UU.). Se incubaron 10 μ l de producto de PCR con 10 μ l de mezcla de reacción a 37°C durante 8 horas.

Si en la posición 894 del exón 7 hay un nucleótido de timina no se digiere el fragmento amplificado, de modo que se observa una sola banda de 457pb en el gel de agarosa (Alelo *Asp* 298). Si se produce la digestión, se debe a que en esa posición hay un nucleótido de guanina (alelo 298 *Glu*) y se detectan dos bandas de 137 y 320 pb (Figura 27).

Figura 27. Esquema de la detección del polimorfismo Glu298Asp del gen de la ONS



Polimorfismo -786 (T→C)

Se localiza en el promotor del gen *Nos*. Esta mutación de la región 5' flanqueante del gen *Nos* consiste en el cambio de una timina por una citosina en la posición -786.

La técnica para la detección de esta mutación, puesta a punto para este trabajo, resulta más sencilla y reduce los costes en comparación con la anteriormente descrita por Nakayama y col. (1999). Los cebadores se diseñaron de modo que, de existir la mutación, se genera una diana de restricción *NaeI* que permite la detección del polimorfismo. La secuencia de los cebadores es la siguiente: cebador NOS-786D (sentido): 5'-GTGTACCCACCTGCATT CT-3'; cebador NOS-786R (antisentido): 5'-GGGGAGGTGAAGGAGAGAAC-3'.

Condiciones de amplificación: mezcla de reacción: en un volumen total de 25 µl, 10 pM/µl de cada cebador; 2,5 mM de cada nucleótido; 75 mM Tris-HCL pH 9; 20 mM (NH₄)SO₄; 2mM MgCl₂; 50 mM KCl; 0.1% Triton X-100; 0,5 U de Taq polimerasa; 16 µl H₂O 100 ng de ADN.

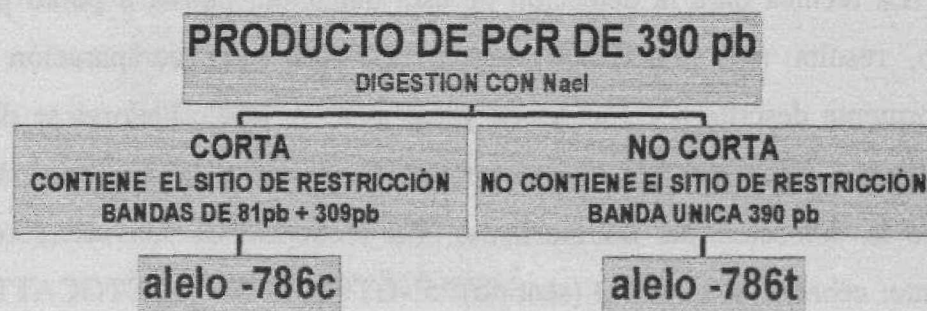
Programa del termociclador:

94°C (desnaturalización inicial), 4 min.	
94°C (desnaturalización), 30 seg.	} 35 ciclos
60°C (hibridación), 30 seg.	
72°C (síntesis), 30 seg.	
72°C (síntesis final), 5 min.	

Mezcla de reacción para la enzima *NaeI*: en un volumen de 10 µl; 7 µl de H₂O autoclavada, 2 µl tampón de digestión y 1 µl (0,5 U) de enzima *NaeI*. Se incubaron a 37°C durante toda la noche 10 µl de producto de PCR con 10 µl de mezcla de reacción. Cuando en la posición -786 aparece una citosina en lugar de una timina, la enzima *NaeI* digiere el fragmento amplificado de 390 pb, pudiéndose visualizar dos bandas de 81 y 309 pb (alelo -786 c). Si en esa posición hay una timina no se produce digestión y se obtiene una única banda de 390 pb (alelo -786t) (Figura 28).

La visualización se realizó en gel de agarosa al 3%, teñido con bromuro de etidio.

Figura 28. Esquema de la detección del polimorfismo -786 T→C del gen de la ONS.



4.9. MÉTODOS ESTADÍSTICOS.

Los datos obtenidos en esta tesis se han incluido en la base informática "Dbase III plus" y se han analizado utilizando el software del paquete estadístico SPSS PC+ de la Unidad de Medicina de Familia y Docencia de la Gerencia de Atención Primaria de Albacete y el Programa Statcalc del Epi Info 5.01, para el análisis de los alelos con tablas de contingencia 2x2. El análisis de los datos se desarrolló con la siguiente estrategia:

1.-Etiquetado de variables, etiquetado de los valores de las variables y definición de casos perdidos (*missing*) para cada una de ellas.

2.-Descripción de cada una de las variables.

a) Análisis de los diferentes fenotipos y antecedentes familiares, mediante:

-Tablas de distribución de frecuencias.

-Gráficos de frecuencias, histogramas, diagramas de barras y diagramas de sectores, según el tipo de variable estudiada.

-Descripción de las medidas de tendencia central y dispersión de cada una de las variables cuantitativas del estudio.

b) Análisis descriptivo de los datos genotípicos.

3.- Estudio de la asociación entre pares de variables según criterios biológicos, entre las principales variables dependientes e independientes y cuantificación del grado de asociación mediante el cálculo del grado de significación "P" (considerando una diferencia significativa si $P < 0,05$), con los siguientes estadísticos:

- "ji-cuadrado" para relación entre variables categóricas.

- "t-Student" y Análisis de la Variancia para la comparación de medias.

-Correlación y Regresión para el análisis de dos variables cuantitativas.

El diseño empleado fue el siguiente:

a) Análisis de los antecedentes personales de enfermedades cardiovasculares en grupos casos y controles mediante la prueba de ji-cuadrado.

b) Análisis de la agregación familiar:

- Entre grupos primer quintil y quinto quintil con antecedentes familiares de cardiopatía isquémica, con la prueba de ji-cuadrado.

- Entre grupos primer quintil y quinto quintil con antecedentes familiares de diabetes mellitus, con la prueba de ji-cuadrado.

- Entre grupos primer quintil y quinto quintil con antecedentes familiares de HTA, con la prueba de ji-cuadrado.

c) Análisis comparativo de los factores de riesgo cardiovascular con los grupos primer quintil y quinto quintil, mediante la prueba de ji-cuadrado para los factores de riesgo cardiovascular cualitativos y la t-Student par los factores de riesgo vascular que son variables cuantitativas.

d) Estudio comparativo de las variables bioquímicas en los grupos de casos y controles, y en los diferentes genotipos de lo genes estudiados mediante análisis de la varianza.

e) Estudio de la distribución de los diferentes genotipos analizados, entre los grupos con la prueba de ji-cuadrado, *odds-ratio* y su intervalo de confianza.

f) Se analizaron las frecuencias alélicas de los diferentes polimorfismos mediante tablas de contingencia 2x2, cálculo del ji-cuadrado, el *odds-ratio* y su intervalo de confianza.

4.- Análisis multivariante: regresión logística para analizar las principales variables dicotómicas y observar las variables modificadoras (edad, sexo, IMC, etc.), variables de confusión a las que se asocia y la modificación que estas producían sobre el *odds-ratio*. Regresión múltiple si la variable principal de estudio es una variable cuantitativa.

Se usó el Test de *Kolmogorov-Smirnov* para verificar que los datos tenían una distribución normal.

5. RESULTADOS

5.1. CARACTERÍSTICAS DE LA POBLACIÓN ESTUDIADA

La población total de este estudio es una muestra representativa de Albacete y provincia de 1.322 sujetos, 600 individuos son residentes en la ciudad de Albacete y 722 en el resto de la provincia. De ellos 612 (46,4%) son hombres y 710 (53,6%) son mujeres. A continuación se presenta la Tabla 6 con la distribución por grupos de edad y sexo:

Tabla 6. Distribución de la población total de estudio por grupos de edad.

	18 – 44 años N (%)	45 – 64 años N (%)	>64 años N (%)
Hombres	275 (20,8)	195 (14,8)	142 (10,8)
Mujeres	307 (23,2)	249 (18,8)	154 (11,6)
Total	582 (44)	444 (33,6)	296 (22,4)

N= número de participantes.

De esta población, ajustando por edad y sexo, y por niveles de PA, se extrajo la submuestra de 612 sujetos, que corresponden a los quintiles extremos de PA, de los que finalmente acudieron a la cita para su inclusión en el estudio, 412 individuos. El porcentaje de mujeres participantes fue algo superior (54%), con 225 mujeres frente a 187 hombres (46%). Se destaca que los hombres acuden en menor número debido a la mayor ocupación laboral. Asimismo la respuesta a la colaboración para este estudio es mayor en zonas rurales que en la capital, 72,9% de los requeridos frente al 60,8%, respectivamente.

En la Tabla 7 se muestra en detalle la distribución por localidades y número de participantes.

Tabla 7. Número de participantes según la localidad de origen.

Localidad	Población	Citados	Estudiados
Albacete	134.584	283	172
La Roda	12.900	65	46
Almansa	22.373	61	43
Casas Ibañez	3.822	67	52
Chinchilla	3.319	14	10
Montealegre	2.193	27	21
Tarazona	5.726	41	30
Casas J. Núñez	1.204	8	5
Navas de Jorquera	597	8	5
Mahora	1.343	7	6
Pétrola	1.052	5	3
Socovos	1.982	10	5
Yeste	4.271	14	10
Letur	1.295	4	4

Censo poblacional de 1.991

A continuación se exponen las tablas que representan por estratos de edad la población muestral que se ha estudiado.

Tabla 8. Distribución por edades de la población total de la muestra del estudio.

	< 34 años	35 - 44 años	45 - 54 años	55 - 64 años	65 - 74 años	>74 años
Nº=412	86	67	61	92	68	38
(%)	(20,9)	(16,3)	(14,8)	(22,3)	(16,5)	(9,2)

Nº = número de participantes

El mayor número de individuos corresponde a los grupos de individuos menores de 34 años (86 participantes) y al grupo comprendido entre los 55 y 64 años (92 participantes).

Los datos referidos a la muestra total (412 individuos), antes de estudiar las diferencias por quintiles fueron los siguientes: La PAS media de la muestra total (primer y quinto quintiles) fue de **127,14 mmHg** (DE= 21,44 mmHg) y la PAD media de **76,07 mmHg** (DE= 12,21 mmHg); con

una edad media de 51,78 años (DE= 16,68 años). Las medias de peso y talla fueron 74,52 kg (DE= 13,80 kg) y 160,76 cm (DE= 9,04 cm) respectivamente, con un perímetro de cintura de 91,80 cm (DE= 13,10 cm) y cadera de 104,85 cm (DE= 10,69 cm).

Con la finalidad de estudiar la asociación de factores genéticos y ambientales con la PA se establecieron dos grupos de individuos que corresponden a los valores más bajos de PA (primer quintil) y a los valores más altos de PA (quinto quintil). Las características de los quintiles se resumen en las tablas 9 y 10.

Tabla 9. Medias de edad, PAS, PAD y % de hombres de los 412 individuos seleccionados en los dos quintiles.

	Edad (DE)	% ♂	PAS (DE) mmHg	PAD (DE) mmHg
1^{er} quintil Nº=198	50,4 (17,8)	44,7	116,99 (16,26)	72,03 (10,88)
5^o quintil Nº=214	51,6 (17,9)	47,9	138,44 (21,71)	79,81 (12,92)
P	<i>n.s.</i>	<i>n.s.</i>	< 0,01	< 0,01

PAS: presión arterial sistólica. PAD: PA diastólica. Nº: número de individuos
DE: desviación estándar. *n.s.*: no significativo.

Las diferencias entre los grupos referidas a edad y sexo no son significativas.

En la Tabla 10 se muestra la distribución por edades y sexo en ambos quintiles

Tabla 10. Distribución muestral de hombres y mujeres por grupos de edad.

Hombres	< 34 años	35 – 44 años	45 – 54 años	55 – 64 años	65 – 74 años	> 74 años
5^o quintil	19	16	14	25	17	10
1^{er} quintil	17	17	12	15	16	9
Mujeres						
5^o quintil	26	17	18	21	20	11
1^{er} quintil	24	17	17	31	15	8

De la muestra global de 412 participantes, 198 (48,1%) corresponden al primer quintil, es decir al grupo de PA más baja, de los que el 55,3% eran mujeres; con una PAS media de **116,98** mmHg (DE= 16,26 mmHg) y una PAD media de **72,03** mmHg (DE= 10,68 mmHg). El quinto quintil, es decir el grupo de sujetos con PA más alta constó de 214 individuos (51,9% de la muestra), de ellos el 52,1% mujeres. La PAS media fue **138,44** mmHg (DE= 21,71 mmHg) y la PAD media **79,81** mmHg (DE= 12,92 mmHg).

En las tablas 11 y 12 se muestran las diferencias por quintiles, sexo y edad de la PA.

Tabla 11. Presión arterial media según sexo y grupo.

	5º Quintil		1º Quintil	
SEXO	Hombre	Mujer	Hombre	Mujer
PAS	140,73	136,40	116,98	117,00
(DE)	(16,06)	(25,49)	(11,33)	(19,00)
PAD	81,45	78,92	73,43	70,79
(DE)	(11,65)	(12,39)	(9,34)	(9,98)

PAS = presión arterial sistólica; PAD = presión arterial diastólica; DE = desviación estándar.

Se observa que los hombres tienen mayor PAS media y PAD media en el grupo del quinto quintil, sin embargo las mujeres del primer quintil tienen mayor PAS media.

En la Tabla 12 se muestran las PAS y PAD medias, según sexo y grupos de edad.

Tabla 12. Niveles de PA media según sexo y grupo y estrato de edad.

EDAD (años)	5° QUINTIL				1° QUINTIL			
	Hombre		Mujer		Hombre		Mujer	
	PAS	PAD	PAS	PAD	PAS	PAD	PAS	PAD
I (< 34)	128,60 (8,88)	73,75 (11,28)	110,21 (9,30)	69,81 (11,05)	112,94 (9,84)	71,61 (12,04)	100,75 (9,03)	61,64 (6,46)
II (35-44)	132,85 (9,37)	83,56 (10,36)	117,76 (12,32)	74,71 (9,10)	113,41 (8,39)	75,18 (6,56)	105,10 (8,31)	67,29 (6,36)
III (45-54)	138,95 (19,98)	88,71 (7,85)	134,09 (16,89)	83,19 (11,28)	117,50 (7,31)	75,92 (9,25)	113,61 (14,82)	72,63 (7,66)
IV (55-64)	143,81 (10,85)	86,16 (8,58)	153,90 (17,93)	86,86 (8,79)	118,76 (10,65)	76,22 (8,08)	123,53 (15,61)	77,18 (11,34)
V (65-74)	154,16 (18,26)	81,69 (11,79)	156,30 (18,37)	83,73 (10,10)	118,88 (15,98)	72,67 (8,89)	132,82 (15,07)	72,27 (7,24)
VI (>74)	148,34 (14,82)	70,33 (11,38)	161,27 (23,37)	76,12 (15,86)	124,30 (11,94)	66,96 (9,22)	143,25 (22,52)	74,25 (6,09)

Los datos se expresan como media y desviación estándar. PAS: presión arterial sistólica; PAD: presión arterial diastólica.

De estos datos se extraen las conclusiones siguientes:

- Los individuos que componen los quintiles primero y quinto no muestran diferencias significativas en edad ni en proporción de sexos, son homogéneos para esas dos variables.
- El máximo valor de la PAS media se encuentra en las mujeres del quinto quintil o grupo de la PA más alta (161,27 mmHg), en el VI estrato de edad (mayores de 74 años).
- La PAS media va aumentando según se incrementa la edad en todos los grupos, excepto en los hombres del quinto quintil, en que aumenta hasta el V estrato de edad (65 a 74 años) para luego disminuir en los hombres mayores de 74 años, lo que podría explicarse por la mayor mortalidad cardiovascular en este tramo de edad y sexo.
- Los valores mínimos de la PAS media y PAD media los encontramos en las mujeres más jóvenes del primer quintil (100,75 y 61,64). Debido probablemente a la influencia positiva de las hormonas femeninas en las enfermedades cardiovasculares.

- El nivel mayor de la PAD media corresponde a las mujeres del quinto quintil en el IV estrato de edad (55 – 64 años).
- La PAD media va aumentando en todos los grupos desde el estrato I de edad hasta el IV, para luego disminuir en las etapas de edad V y VI.
- Tanto en el quinto quintil como en el primer quintil la PAS media y la PAD media es mayor en las mujeres a partir de los 55 años.
- Por el contrario, hasta los 55 años la PAS media y PAD media son mayores en los hombres de ambos grupos.

5.2. ANTECEDENTES PERSONALES DE ENFERMEDAD CARDIOVASCULAR

Por su relación con la PA se consideró de interés conocer la prevalencia de antecedentes personales de enfermedad cardiovascular en la muestra estudiada. En la Tabla 13 se exponen los datos obtenidos de dicho análisis.

Tabla 13. Antecedentes personales de interés cardiovascular de la muestra global

	Nº (%)		TOTAL
	SÍ	NO	
Insuf. Cardíaca	25 (6,1)	387 (93,9)	412 (100)
ACV	7 (1,7)	405 (98,3)	412 (100)
C. Isquémica	14 (3,4)	398 (96,6)	412 (100)
Insuficiencia renal	4 (1)	408 (99)	412 (100)
Diabetes Mellitus	59 (14,3)	349 (84,7)	408 (99)
Dislipemia	119 (28,9)	270 (65,5)	389 (94,4)
Fumador	117 (28,4)	291 (70,6)	412 (100)
Alcohol	229 (55,6)	183 (44,4)	412 (100)

Nº = número de participantes. ACV = accidente cerebrovascular.

En la tabla anterior llama principalmente la atención la proporción de individuos que consumen alcohol diariamente (55,6 %). Este dato significa que se tomaba una bebida alcohólica al día, de modo que no se conocen con exactitud los gramos de alcohol consumidos. El análisis del consumo de alcohol por quintiles no mostró diferencias significativas como se muestra en la Tabla 14. Es destacable la elevada prevalencia de diabetes *mellitus*, que aparece en un 14,3 % de los participantes.

Los análisis sobre factores de riesgo se realizaron por separado en ambos quintiles, no hallándose diferencias significativas en ninguno de los parámetros anteriormente expuestos entre ambos quintiles (Tablas 14 y 15).

Tabla 14. Factores de riesgo cardiovascular del quinto quintil frente al primer quintil.

VARIABLE	Quinto quintil N (%)	Primer quintil N (%)	TOTAL N (%)
Diabetes			
Sí	36 (16,8)	23 (11,6)	59 (14,3)
No	6 (82,2)	(87,4)	349 (84,7)
Dislipemia			
Sí	68 (31,8)	51 (25,8)	119 (28,9)
No	134 (62,6)	136 (68,7)	270 (65,5)
Fumador			
Sí	56 (26,2)	61 (30,8)	117 (28,4)
No	54 (72)	137 (69,2)	291 (70,6)
Alcohol			
Sí	119 (55,6)	110 (55,6)	229(55,6)
No	95 (44,4)	88 (44,4)	183 (44,4)

$P > 0,05$; N°= Número de individuos.

Tabla 15. Antecedentes personales de enfermedad cardiovascular según sexo y nivel de PA.

	5° QUINTIL		1er QUINTIL	
	Hombres	Mujeres	Hombres	Mujeres
	N° (%)	N° (%)	N° (%)	N° (%)
Insuf. Card.	6 (5,9)	7 (6,2)	4 (4,7)	8 (7,1)
ACV	2 (2)	1 (0,9)	1 (1,2)	3 (2,7)
Card. Isque.	4 (4)	3 (2,7)	4 (4,7)	3 (2,7)

$P > 0,05$ N°= Número de individuos.

5.3. AGREGACION FAMILIAR DE LA HTA

Se han analizado los antecedentes familiares HTA en los familiares de primer grado, padres y hermanos, que han desarrollado la enfermedad a una edad inferior a 50 años, lo que se considera importante para discernir un origen genético y no debido a los efectos de la edad, tan relevantes en el caso de las enfermedades cardiovasculares.

Tabla 16. Antecedentes de HTA antes de los 50 años en familiares de individuos de los quintiles primero y quinto.

	5º QUINTIL Nº (%)			1º QUINTIL Nº (%)		
	Sí	No	No sabe	Sí	No	No sabe
Padres	26 (12,1)	133 (62,1)	55 (25,7)	12 (6,1)	134 (67,7)	52 (26,3)
Madres	31 (14,5)	139 (65)	44 (20,6)	21 (10,6)	140 (70,7)	37 (18,7)
Hermanos	23 (10,7)	168 (78,5)	23 (10,7)	5 (2,5)	162 (81,8)	31 (15,7)
Hermanas	20 (9,3)	175 (81,8)	19 (8,9)	8 (4)	157 (79,3)	33 (16,7)

Nº = número de participantes.

Se puede apreciar que los antecedentes familiares de HTA antes de los 50 años, en el quintil de mayor PA (quinto quintil), son más prevalentes que en el grupo de PA inferior (primer quintil). En la Tabla 17 se muestran los análisis estadísticos de antecedentes familiares de HTA de los individuos de los quintiles primero y quinto.

Tabla 17. Progenitores y hermanos con antecedentes de HTA en los individuos de los quintiles primero y quinto.

	Progenitores del 5º quintil	Progenitores del 1º quintil	P	OR	IC (95%)
HTA	57	33	0,03	1,787	1,061 – 3,009
	Hermanos 5º quintil	Hermanos 1º quintil	P	OR	IC (95%)
HTA	36	12	0,002	2,845	1,425 5,679

HTA = hipertensión arterial; OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza.

De los anteriores datos se deduce que la agregación familiar de la HTA es mayor entre hermanos que entre padres e hijos. Si se analizan conjuntamente padres y hermanos se obtiene el siguiente resultado, expuesto en la Tabla 18.

Tabla 18. Antecedentes de HTA en padres y hermanos de individuos del quinto quintil de PA frente a los del primer quintil.

	Padres y hermanos 5º quintil	Padres y hermanos 1º quintil	P	OR	IC (95%)
HTA	62	31	0,002	2,234	1,337 – 3,732

HTA = hipertensión arterial; OR = odds ratio; IC = intervalo de confianza

5.4. FACTORES DE RIESGO CARDIOVASCULAR

A continuación se muestran los resultados obtenidos al analizar diversos factores considerados de riesgo cardiovascular en los dos quintiles. La Tabla 19 muestra las principales variables cuantitativas extraídas del estudio poblacional.

Tabla 19. Variables cuantitativas del 5º quintil frente al 1º quintil.

VARIABLE	5º QUINTIL Media (DE)	1º QUINTIL Media (DE)	P	TOTAL
PAS (mm Hg)	138,44 (21,71)	116,98 (16,26)	NS	127,99 (21,98)
PAD (mm Hg)	79,81 (12,92)	72,03 (10,88)	NS	76,07 (12,21)
IMC kg/m ²	29,14 (4,97)	26,30 (4,21)	0,001	29,10
cintura (cm)	95,34 (12,91)	87,98 (12,23)	NS	91,804 (13,10)
cadera (cm)	107,40 (9,97)	102,94 (10,79)	NS	104,852 (10,69)
glucosa (mg/dl)	96,15 (45,58)	90,39 (28,34)	NS	93,38 (38,34)
colesterol (mg/dl)	200,12 (57,80)	201,76 (48,05)	NS	200,91 (53,28)
cHDL(mg/dl)	51,81 (17,15)	54,40 (16,59)	NS	53,06 (16,91)
Triglicéridos(mg/dl)	119,94 (93,43)	105,08 (57,01)	0,048	112,80 (78,34)

NS = no significativo; IMC = índice de masa corporal; cHDL = colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad.

En el quinto quintil se aprecia un mayor perímetro de cintura y cadera; niveles más elevados de triglicéridos (significativo); niveles más elevados de glucosa; Niveles más bajos de cHDL y un IMC significativamente más elevado. Esta última variable cuantitativa merece especial atención por su destacable relación con la PA. Es aceptado que los individuos con mayor PA presentan los mayores IMC y el aumento del IMC conlleva un aumento proporcional de las enfermedades cardiovasculares. El IMC es calculado con la siguiente fórmula: $IMC = \text{peso en Kg} / \text{talla en m}^2$. Su correlación con el porcentaje de grasa corporal medido por otros métodos más exactos es muy alta, aunque no perfecta (puede afirmarse que el 78% del exceso de peso es grasa), siendo menos fiable en adolescentes y atletas con más magra corporal (Martín-Peña, 1994). El índice cintura-cadera (ICC) se calcula dividiendo el perímetro de la cintura en cm por el de la cadera en cm. En la Tabla 20 se muestran los resultados obtenidos al calcular el IMC, y el ICC y compararlos por quintiles y con las medias de PAS y PAD.

Tabla 20. Comparación de medias de IMC, ICC, PAS y PAD entre primer y quinto quintiles

	PAS (DE) mmHg	PAD (DE) mmHg	IMC (DE)	ICC (DE)
1^{er} quintil	117,3 (16,5)	72,1 (10)	26,3 (4,3)	0,85 (0,09)
5^o quintil	138* (21,4)	79,8* (12,1)	29,1* (5)	0,89* (0,08)

$P < 0,001$ entre grupos.

PAS= presión arterial sistólica; PAD= presión arterial diastólica; IMC= índice de masa corporal; ICC= índice cintura cadera; DE= desviación estándar

Los individuos de mayor PA poseen mayores valores de IMC e ICC. En la clasificación del sobrepeso y la obesidad según el IMC, establecido en el Consenso SEEDO' 2000, se define sobrepeso de grado I a un IMC entre 25 y 26,9 y a partir de 26,9 sobrepeso de grado II o preobesidad (SEEDO' 2000). Se comparó el nº de individuos de uno y otro quintil que manifiestan preobesidad y obesidad (Tabla 21), con la finalidad de apreciar si existían diferencias entre ambos quintiles con relación a una patología, obesidad, implicada en el aumento de la PA.

Tabla 21. Porcentaje de individuos con IMC $\geq 26,9$ en ambos quintiles.

	IMC $\geq 26,9$		
	NO Nº (%)	SI Nº (%)	Total
1^{er} quintil	124 (62)	73 (34,6)	197 (47,9)
5^o quintil	76 (38)	138 (65,4)	214 (52,1)
Total	200 (100)	211 (100)	411 (100)

$P < 0,001$

IMC = índice de masa corporal. Nº: número de individuos

En el quinto quintil hay sobrepeso u obesidad en el 65% de individuos frente al 34 % del primer quintil.

5.5. POLIMORFISMOS DEL GEN DEL ANGIOTENSINÓGENO

Se han analizado dos polimorfismos localizados en el exón 2 del gen del AGT, que han mostrado asociación con aumento de PA en otras poblaciones, estos son los denominados *T174M* y *M235T*.

Las frecuencias alélicas y genotípicas en nuestra población de estudio están en equilibrio según la ley de Hardy-Weimberg. La comprobación se realizó con el programa GDA (Genetics Data System) (Wen, 1996). El resultado de la χ^2 entre las frecuencias esperadas y observadas fue de 0,77 ($P > 0,05$) para el polimorfismo *T174M*, y para el *M235T*, $\chi^2 = 0,77$ ($P > 0,05$). Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *T174M* y *M235T*, halladas en la población muestral previamente a su estudio por quintiles, se muestran en la Tabla 22.

Tabla 22. Frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos *T174M* y *M235T* del gen *Agt* en la población estudiada.

GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
M174M	T174M	T174T	174M	T174
4 (1)	91 (23)	306 (76)	0,13	0,87
M235M	M235T	T235T	M235	235T
117(29)	206 (51)	78 (20)	0,548	0,451

Se obtuvieron resultados de 401 individuos, no de los 412 que componen el estudio, debido a pérdidas en el ADN y genotipado de once de ellos. A continuación se muestra el análisis por quintiles de los polimorfismos del gen *Agt* estudiados.

5.5.1. Polimorfismo *T174M*

Este polimorfismo consiste en el cambio de un nucleótido de timina por un nucleótido de citosina en la posición 521 del exón 2 del gen, responsable del cambio del aminoácido treonina (T) por metionina (M) en el AGT. La presencia de una citosina da lugar a una diana de restricción para la enzima *NcoI* de forma que sólo el alelo *174M* es digerido por esta enzima. En la Figura 29 se muestra un ejemplo representativo de análisis de los polimorfismos en gel de agarosa.

Figura 29. Determinación del polimorfismo *T174M* en el exón 2 del gen del AGT mediante digestión enzimática con *NcoI* y análisis en gel de agarosa al 1,5%.



En las tablas 23 y 24 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas halladas en el polimorfismo *T174M* en la población de Albacete y su distribución por quintiles de PA.

Tabla 23. Frecuencia de los alelos del polimorfismo T174M en ambos quintiles

ALELOS (Frecuencia)		
	174M	T174
1 ^{er} Quintil	57 (0,145)	335 (0,855)
5 ^o Quintil	42 (0,102)	368 (0,898)

$P=0,064$

Tabla 24. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo T174M en en los quintiles primero y quinto.

	GENOTIPOS N° (%)		
	M174M	M174T	T174T
1 ^{er} quintil (N°=196)	3 (1,5)	51 (26,1)	142 (72,4)
5 ^o quintil (N°=205)	1 (0,5)	40 (19,5)	164 (80)

$P=0,156$

N°.= número de individuos

También se determinó el valor medio del IMC según los genotipos del polimorfismo *T174M*. Los resultados se muestran en la Tabla 25.

Tabla 25. Valor del IMC según los genotipos del polimorfismo T174M.

	M174M	M174T	T174T
N° individuos	4	91	305
IMC (media)	25,84	27,44	27,85
DE	4,70	4,24	5,01

$P=0,5680$

IMC= índice de masa corporal. DE= desviación estándar.

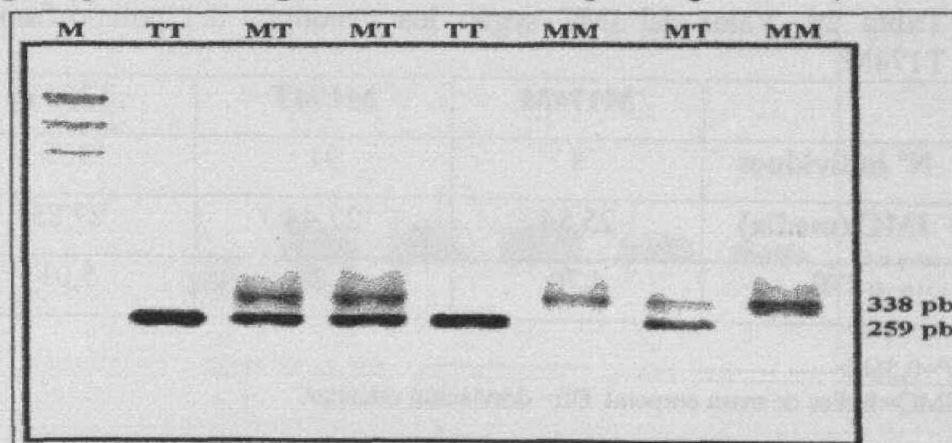
En las tablas 23 y 24 se observa que no existen diferencias significativas en la distribución de los alelos o de los genotipos entre los quintiles, si bien es destacable que el alelo *T* es más frecuente en el 5º quintil. Aunque sin diferencias significativas, se observa un aumento de IMC conforme aparece el alelo *T* en el genotipo (Tabla 25).

Se estudiaron los genotipos del polimorfismo *T174M* en relación con los antecedentes familiares de HTA, no encontrando diferencias significativas: $P=0,6709$ (no se muestran los datos). Con el fin de minimizar el efecto de la edad en la PA, se realizó un estudio de este polimorfismo en individuos con una edad inferior a 50 años, sin encontrarse nuevamente diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre ambos quintiles ($P=0,3557$) (no se muestran los datos).

5.5.2. Polimorfismo *M235T*

Este polimorfismo consiste en el cambio de un nucleótido de timina por otro de citosina en la posición 704 del exón 2 del gen. Ese cambio genera una diana de restricción para la enzima *Bst*UI, de modo que si existe, el fragmento amplificado de 338 pb, es digerido y aparecen dos fragmentos de 259 y 59 pb, tratándose en este caso del alelo 235T. La Figura 30 representa los genotipos correspondientes al polimorfismo *M235T* analizados mediante electroforesis en gel de agarosa.

Figura 30. Determinación del polimorfismo *M235T* en el exón 2 del gen *Agt* mediante digestión con *Bst*UI en gel de agarosa al 1,5%.



En las tablas 26 y 27 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo M235T del gen del AGT en la población estudiada.

Tabla 26. Frecuencia de los alelos del polimorfismo T235M en los quintiles primero y quinto.

ALELOS (Frecuencia)		
	M235	235T
1 ^{er} Quintil	208 (0,531)	184 (0,469)
5 ^o Quintil	232 (0,566)	178 (0,434)

$P=0,316$

Tabla 27. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo M235T en los quintiles primero y quinto.

	GENOTIPOS N° (%)		
	M235M	M235T	T235T
1 ^{er} quintil (N°=196)	53 (27)	102 (52)	41 (21)
5 ^o quintil (N°=205)	64 (31)	104 (51)	37 (18)

$P=0,560$

N°= número de individuos

Al igual que se hizo con el polimorfismo T174M se realizó un análisis comparativo de la media de IMC según el genotipo del polimorfismo M235T (Tabla 28).

Tabla 28. Valor del IMC según los genotipos del polimorfismo M235T.

	M235M	M235T	T235T
N° individuos	117	205	78
IMC(media)	27,8856	27,6633	27,7026
D.E	5,5306	4,5239	4,5920

$P=0,922$

IMC= índice de masa corporal. N°= número de individuos

Las tablas 26 y 27 no muestran que existan diferencias significativas entre ambos quintiles en las frecuencias de alelos o genotipos del polimorfismo M235T. Se analizaron los genotipos del

polimorfismo M235T y el IMC sin observarse diferencias significativas (Tabla 28).

Se estudiaron los genotipos en relación con los antecedentes familiares de HTA, sin encontrarse diferencias significativas: $P=0,6709$ (no se muestran los datos). Se realizó un estudio de este polimorfismo en individuos con una edad inferior a 50 años sin encontrar diferencias significativas en la distribución de los genotipos entre ambos quintiles ($P=0,3557$). No se muestra la tabla con estos resultados.

5.5.3. Estudio conjunto de ambos polimorfismos

Se realizó un estudio conjunto de los dos polimorfismos del gen del angiotensinógeno por su significado biológico. Las moléculas de AGT en cada individuo son el resultado de ambos polimorfismos (y de muchos otros). Es pues lógico observar conjuntamente las dos variantes en cada molécula de AGT. Se analizó la relación que existe entre las sustituciones de los aminoácidos 174 y 235 de forma conjunta en la cadena polipeptídica del angiotensinógeno y los valores de PA.

Existen nueve combinaciones posibles de los genotipos de estos dos polimorfismos. De ellos se encontraron solamente seis en nuestra población: *T174T-T235T*; *T174M-T235T*; *T174T-M235M*; *T174T-M235T*; *T174M-M235T*; *M174M-T235T*. Las tres siguientes no han aparecido: *M174M-M235M*; *T174M-M235M*; *M174M-M235T*.

La Tabla 29 muestra las frecuencias de estos genotipos conjuntos del gen *Agt* en los quintiles primero y quinto.

Tabla 29. Distribución de los genotipos *T174M-M235T* del gen *Agt* en ambos quintiles.

GENOTIPOS 174-235 DEL GEN <i>Agt</i> N° (%)						
	TTMM	TTMT	TMMT	TTTT	TMTT	MMTT
Primer Quintil N°=196	53 (27,0)	72 (36,7)	30 (15,3)	17 (8,7)	21 (10,7)	3 (1,5)
Quinto Quintil N°=205	64 (31,2)	76 (37,1)	28 (13,7)	24 (11,7)	12 (5,9)	1 (0,5)
Totales 401	117 (29,2)	148 (36,9)	58 (14,5)	41 (10,2)	33 (8,2)	4 (1,0)

 $P=0,3405$

N°= número de individuos

La Tabla 29 muestra que, aunque no existen diferencias estadísticamente significativas, el genotipo *T174T-T235T* (TTTT) es más frecuente en el quinto quintil, mientras que aparece una mayor frecuencia del genotipo *T174M-T235T* (TMTT) en el primer quintil. Si comparamos estos dos genotipos con el resto, la diferencia es algo mayor, como se observa en la Tabla 30. La relevancia de esta tendencia queda de manifiesto al estudiar los antecedentes familiares de la HTA, como se muestra en el siguiente apartado.

Tabla 30. Distribución de los genotipos *T174T-T235T* y *T174M-T235T* comparados con el resto de genotipos en el primer y quinto quintiles.

	T174T-T235T N° (%)	Otros genotipos*	T174M-T235T N° (%)	Otros genotipos**
1^{er} quintil (N° = 196)	17 (8,7)	179 (91,3)	21 (10,7)	175 (89,3)
5^o quintil (N°=205)	24 (11,7)	181 (88,3)	12 (5,9)	193 (94,1)

 $P=0,316$ $P=0,148$

*T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T, T174M-T235T y M174M-T235T.

**T174T-T235T, T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T y M174M-T235T.

Los genotipos M174M-M235M, T174M-M235M y M174M-M235T, no están en esta población

N°= Número de individuos

Relación de los genotipos conjuntos con antecedentes familiares de HTA

La relación existente entre los genotipos y los antecedentes familiares de HTA se puso de manifiesto cuando se compararon los genotipos conjuntos anteriores, con los antecedentes familiares de HTA (Tabla 31). Se comparó cada uno de los seis genotipos conjuntos, aunque solamente mostró diferencias significativas el genotipo *T174T-T235T*, (Tabla 31).

Tabla 31. Distribución del genotipo *T174T-T235T* según la historia familiar de HTA.

	T174T-T235T Nº (%)	Otros genotipos* Nº (%)
Sin historia familiar de HTA (Nº =294)	24 (8,2)	270 (91,8)
Historia familiar de HTA (Nº=107)	17 (15,9)	90 (84,1)

P=0,024.

**T174T-M235M*, *T174T-M235T*, *T174M-M235T*, *T174M-T235T* y *M174M-T235T*.

Los genotipos *M174M-M235M*, *T174M-M235M* y *M174M-M235T*, no están en esta población.

Nº= Número de individuos.

Se observa que en este caso la diferencia es significativa, lo que nos podría indicar que el genotipo *T174T-T235T* es un posible marcador de predisposición a hipertensión en individuos con una historia familiar de HTA.

También se comparó el genotipo *T174M-T235T* con antecedentes familiares de HTA (Tabla 32).

Tabla 32. Distribución del genotipo *T174M-T235T* según la historia familiar de HTA.

	T174M-T235T Nº (%)	Otros Genotipos** Nº (%)
Sin historia familiar HTA (Nº= 294)	27 (9,2)	267 (90,9)
Historia familiar de HTA (Nº= 107)	6 (5,6)	101 (94,4)

$P=0,05072$

**T174T-T235T, T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T, y M174M-T235T.

Los genotipos M174M-M235M, T174M-M235M y M174M-M235T, no aparecen en esta población.

No se detectaron diferencias estadísticamente significativas, aunque se aprecia una tendencia a la asociación de este genotipo (T174M-T235T) con la ausencia de antecedentes familiares de HTA.

En la Tabla 33 se muestran los resultados obtenidos al comparar el genotipo *T174T-T235T* del gen *Agt* con individuos obesos (IMC igual o superior a 30; SEEDO' 2000).

Tabla 33. Genotipo T174T-T235T en individuos obesos (IMC ≥ 30) y no obesos.

	No TTTT Nº (%)	Si TTTT Nº(%)
NO OBESO (Nº=290)	263 (90,7)	27 (9,3)
SI OBESO (Nº=110)	96 (87,3)	14 (12,7)

$P= 0,3143$

Nº= número de individuos

Se advierte una mayor proporción de individuos con el genotipo *TTTT* entre el grupo "obesos", aunque las diferencias no son estadísticamente significativas.

5.5.4. Predicción de estructura secundaria del AGT: estudio de la relación genotipo-fenotipo.

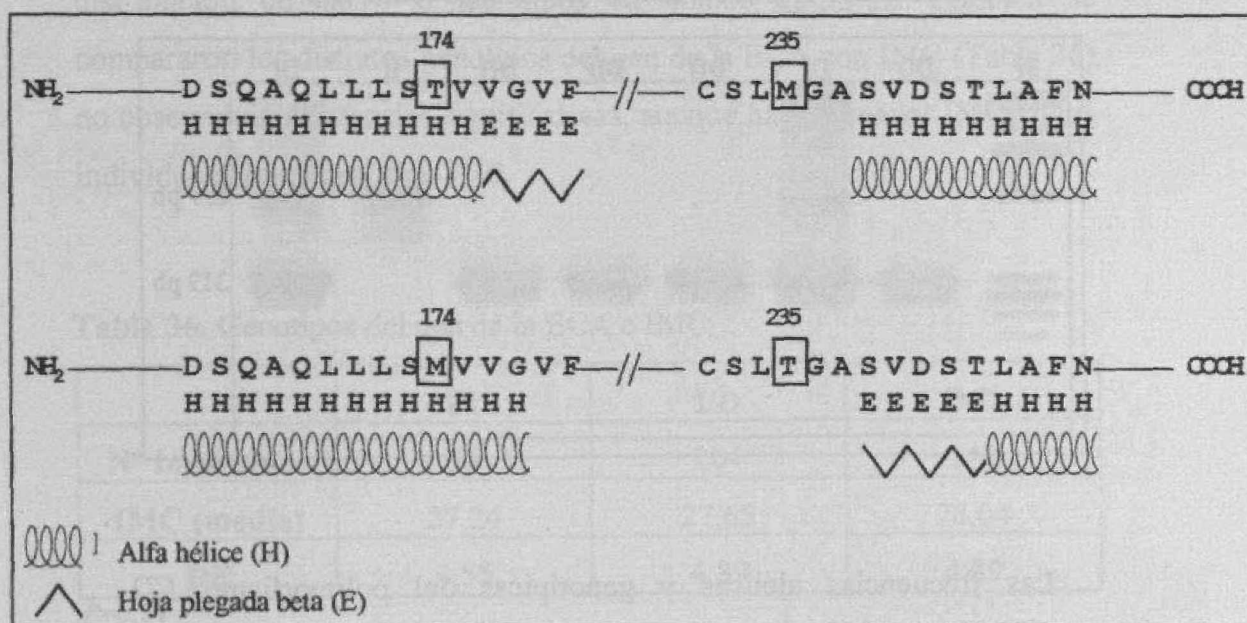
El hecho de haber encontrado un genotipo del gen del AGT que guarda una asociación significativa con los antecedentes familiares de HTA, nos llevó a analizar la posible existencia de un cambio en la estructura de la proteína mutante que pudiera justificar los cambios en su función. Para ello realizamos una predicción de estructura secundaria usando el programa "*Frishmanmulti-layered-method*", del Skirball Institute of Biomolecular Medicine (EE.UU.), accesible en la siguiente dirección de internet: <http://saturn.med.nyu.edu/searching/Sspred/queryss.html>.

La cadena polipeptídica del AGT consta de 452 aminoácidos, encontrándose la secuencia de la angiotensina II en su posición N-terminal. La comparación de la predicción de estructura secundaria de las dos variantes polimórficas de la proteína AGT, muestra que la región que contiene el aminoácido 174 incrementa la proporción de la conformación en hoja plegada beta cuando este residuo es treonina (T174). En el caso del aminoácido 235, la región inmediatamente adyacente, formada por los siete aminoácidos situados hacia el extremo C-terminal (238-242), adopta una estructura alfa helicoidal cuando la variante polimórfica es 235M; sin embargo, adopta una estructura en hoja plegada beta en la variante polimórfica 235T (Figura 31).

Estos datos indican que las dos variantes polimórficas del AGT pueden tener distinta estructura secundaria. Ello podría afectar a su función, lo que explicaría la asociación del polimorfismo T174T-T235T con los antecedentes familiares de HTA.

Los resultados relativos al análisis conjunto de los polimorfismos del gen *Agt* han sido aceptados para su publicación en la revista *British Journal of Biomedical Science* y aparecerán en el ejemplar del mes de marzo del año 2002 (Martínez y col., 2002) (Anexo 5).

Figura 31. Predicción de estructura secundaria del AGT.



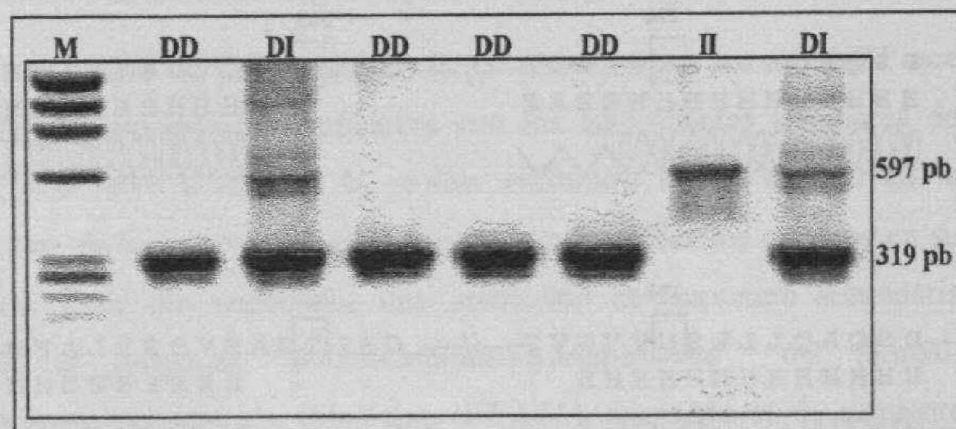
5.6. POLIMORFISMO I/D DEL GEN DE LA ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA II

Con la finalidad de analizar la asociación del polimorfismo I/D del gen de la ECA con los valores extremos de PA en la población de Albacete se realizó un diseño similar al comentado en el caso del gen *Agt*. Se analizaron los 401 individuos referidos en el gen anterior. Las frecuencias alélicas y genotípicas de este polimorfismo se encontraban en equilibrio de Hardy-Weimberg ($\chi^2 = 0,39$; $P > 0,05$).

El polimorfismo *I/D* se encuentra en el intrón 16 del gen de la ECA, y ha mostrado asociación con la variación de PA en numerosos estudios. Consiste en una inserción de 287 pb para el alelo *I* o la ausencia de esa inserción alelo *D*.

En la Figura 32 se muestra un ejemplo de la amplificación del fragmento del intrón en donde se localiza la inserción y su diferenciación por tamaño de los alelos.

Figura 32. Determinación del polimorfismo I/D del gen de la ECA mediante electroforesis en gel de agarosa al 2%.



Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *I/D* obtenidas en la población analizada, previamente al estudio diferencial por quintiles, se muestran en la Tabla 34.

Tabla 34. Frecuencias alélicas y genotípicas del *polimorfismo I/D* del gen de la ECA en la población de Albacete

GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
I/I	I/D	D/D	I	D
56 (14)	205 (51)	140 (35)	(0,4)	(0,607)

Distribución en los quintiles primero y quinto de PA de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA (Tabla 35).

Tabla 35. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA en ambos quintiles

	GENOTIPOS N° (%)			ALELOS N° (frec)	
	I/I	I/D	D/D	I	D
1^{er} quintil (N°=196)	29 (14,8)	96 (49,0)	71 (36,2)	154 (0,393)	238 (0,607)
5^o quintil (N°=205)	27 (13,2)	109 (53,2)	69 (33,7)	163 (0,398)	247 (0,602)

$P=0,697$

N°= número de individuos; frec= frecuencia alélica

$P=0,892$

No se encontraron diferencias estadísticamente significativas en la distribución de alelos o genotipos en ambos quintiles. También se compararon los distintos genotipos del gen de la ECA con IMC (Tabla 36) no observando diferencias significativas, aunque hay un mayor IMC en los individuos con el genotipo *D/D*.

Tabla 36. Genotipos del gen de la ECA e IMC.

	I/I	I/D	D/D
Nº Individuos	56	204	140
IMC (media)	27,24	27,65	28,04
DE	4,55	4,89	4,89

$P=0,54$

Nº= número de individuos; DE= desviación estándar

Con la finalidad de evitar la posible influencia de la edad se realizó el estudio en individuos menores de 50 años (Tabla 37). Este grupo de edad presentaba una proporción de hombres y mujeres similar al encontrado en toda la población.

Tabla 37. Distribución de los genotipos y de las frecuencias alélicas del polimorfismo I/D del gen de la ECA en 1º y 5º quintiles menores de 50 años.

	GENOTIPOS Nº (%)			ALELOS (frec)	
	I/I	I/D	D/D	I	D
1º quintil <50 (Nº= 89)	16 (18,0)	43 (48,3)	30 (33,7)	75 (0,421)	103 (0,579)
5º quintil <50 (Nº=94)	10 (10,6)	51 (53,1)	33 (35,1)	71 (0,377)	117 (0,623)

$P=0,355$

$P=0,394$

Nº= número e individuos; frec= frecuencia alélica

Las diferencias no fueron estadísticamente significativas. Sin embargo en el primer quintil en menores de 50 años, el alelo *I* aparece con mayor frecuencia que en el mismo grupo de la población total.

En algunos estudios han encontrado el genotipo *D/D* asociado a una mayor PA únicamente en hombres (O'Donnell y col., 1998; Fornage y col., 1998). En nuestra población no se corroboró tal resultado (Tabla 38).

Tabla 38. Distribución de los genotipos del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA en el primer y quinto quintiles en hombres.

	GENOTIPOS N° (%)		
	I/I	I/D	D/D
♂ 1 ^{er} quintil (N°=88)	9 (10,2)	49 (55,7)	30 (34,1)
♂ 5 ^o quintil (N°= 98)	16 (16,3)	52 (53,1)	30 (30,6)

$P=0,468$

N°= número e individuos

Se estudió la relación de los polimorfismos del gen de la ECA en individuos con antecedentes familiares de HTA, como se había hecho anteriormente con el gen *Agt*. No se observó asociación entre estas dos variables (Tabla 39).

Tabla 39. Distribución de los genotipos del gen de la ECA según la historia familiar de HTA.

	GENOTIPOS N° (%)		
	I/I	I/D	D/D
Sin historia familiar de HTA (N°= 294)	40 (13,6)	149 (50,7)	105 (35,7)
Con historia familiar de HTA (N°= 107)	16 (15,0)	56 (52,3)	35 (32,7)

$P=0,84029$

N°= número de individuos; HTA= hipertensión arterial

También se analizó la relación entre ataque cardíaco y el alelo D ya que se ha descrito que en algunas poblaciones están asociados (Cambien y col., 1992). Los resultados se muestran en la Tabla 40.

Tabla 40. Frecuencia de los genotipos del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA en individuos que han sufrido ataque cardiaco.

	GENOTIPOS N° (%)		
	I/I	I/D	D/D
No ataque cardiaco (N°=381)	55 (14,4)	196 (51,4)	130 (34,1)
Ataque Cardiaco (N°=13)	1 (7,7)	7 (53,8)	5 (38,5)

$P= 0,7845$

N°= número de individuos

Se observa que los individuos que han sufrido un ataque cardiaco presentan mayor frecuencia de genotipo *D/D* que los individuos que no lo han sufrido. El porcentaje de individuos que no han sufrido ataque cardiaco y tienen genotipo *II* es el doble que los individuos que sí han sufrido ataque cardiaco y tienen este genotipo. Pese a ello las diferencias no son estadísticamente significativas. Será necesario aumentar el tamaño de la muestra para confirmar estos resultados.

5.7. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN ENTRE EL POLIMORFISMO *I/D* DEL GEN DE LA ECA Y LA ACTIVIDAD ENZIMÁTICA.

Con el fin de conocer la relación del genotipo del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA y el fenotipo actividad enzimática, se llevó a cabo el análisis que se expone a continuación. Para la determinación de la actividad de la ECA en suero se eliminaron los individuos de nuestra población que se encontraban en tratamiento con antihipertensivos del tipo inhibidores de la ECA (40 individuos del 5° quintil), ya que ello podría alterar el resultado del estudio. Antes de ello se comparó la actividad enzimática en los grupos de mayor y menor PA, no encontrándose diferencias significativas (Tabla 41).

Tabla 41. Comparación de las medias de ECA según los quintiles de PA.

QUINTILES (Nº)	Actividad enzimática (U/L) (DE)
1 ^{er} QUINTIL (196)	36,70 (18,27)
5º QUINTIL (165)	36,09 (13,52)

$P=0,719$

Nº= número de individuos. DE= desviación estándar. U/L= unidades de ECA por litro

Se ha descrito en la mayoría de las poblaciones analizadas una asociación entre el polimorfismo *I/D* del gen de la ECA y la actividad enzimática en suero. El alelo *D* se ha asociado a un incremento de la misma. Los resultados obtenidos en nuestra población se muestran en la Tabla 42.

Tabla 42. Actividad enzimática de ECA según los diferentes genotipos y niveles de presión arterial en la población total.

Genotipos (Nº)	ECA U/L (DE)	PAS mmHg (DE)	PAD mmHg (DE)
II (52)	29,25 (15,01)	124,4 (19,6)	75,0 (11,1)
ID (183)	34,28 (13,66)	125,7 (21,4)	74,9 (10,8)
DD (124)	42,57* (18,25)	124,4 (22,4)	75,6 (10,9)

$P<0,0001$ comparado con II e ID.

Los datos se expresan como media y desviación estándar (DE)

Nº= Número de individuos; U/L =Unidades de ECA por litro; PAS= PA sistólica;

PAD= PA diastólica.

Se encontró asociación entre el polimorfismo *D* y la actividad enzimática en suero. A mayor número de alelos *D* mayor es la actividad de ECA, como se ha observado en la mayoría de poblaciones analizadas.

En un análisis multivariante, en que la variable dependiente es "Presión Sistólica" y el conjunto de variables independientes son edad, IMC, genotipo y actividad (niveles) de la ECA (Tabla 43), se muestra que solamente la edad y el IMC tienen asociación significativa con la PAS, como ya se ha comentado en tablas anteriores.

Tabla 43. Análisis multivariante de la relación entre la actividad de la ECA, el genotipo y la PAS

Variable dependiente	Variable independiente	Coefficiente
PAS	Edad	0.5249*
	Sexo	-3.322
	IMC	1.3873*
	Actividad ECA	0.0012
PAS	Edad	0.5296*
	Sexo	-3.4268
	IMC	1.3612*
	Genotipo de ECA	0.4367

* $P < 0,0001$

PAS = PA sistólica; IMC = índice de masa corporal.

Los resultados relativos al gen de la ECA de la población objeto de esta tesis han sido publicados en el *Journal of Human Hypertension* (Martínez y col., 2000) (Anexo 5).

5.8. POLIMORFISMOS DEL RECEPTOR TIPO I DE LA ANGIOTENSINA II

Las frecuencias alélicas de estos dos polimorfismos se encontraban en equilibrio de Hardy-Weimberg. Para el polimorfismo *A166C*: $\chi^2 = 0,31$; ($P > 0,05$), para el polimorfismo *C573T*: $\chi^2 = 0,98$; $P > 0,05$.

Con la finalidad de determinar la asociación del gen del receptor tipo 1 de la AII, se han estudiado dos polimorfismos que se localizan en la región 3' no traducida (*A1166C*) y en el exón 5 del gen (*T573C*). El polimorfismo *A1166C* consiste en el cambio de un nucleótido de adenina

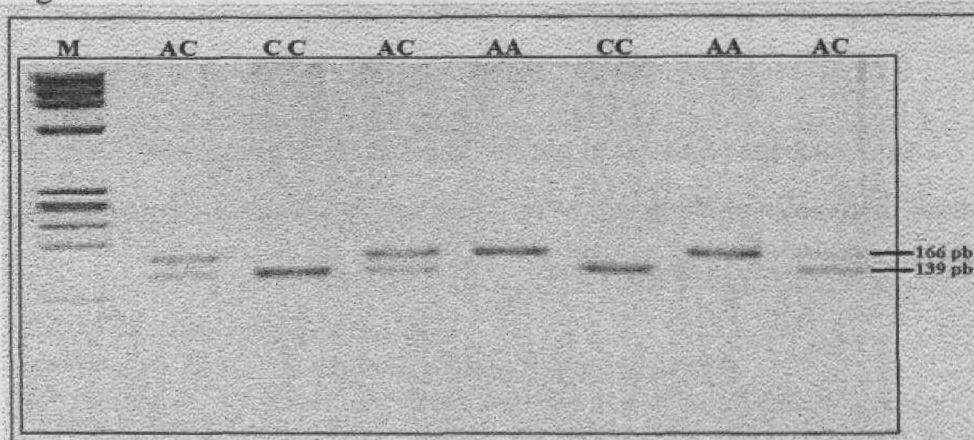
por otro de citosina y ha mostrado asociación con PA en estudios realizados en diferentes poblaciones. El polimorfismo 573 se encuentra en el exón cinco del gen del receptor. Consiste en el cambio silencioso (no cambia el sentido del codón). La asociación de este polimorfismo con la PA ha sido poco estudiada.

5.8.1. Polimorfismo A1166C del receptor AT1

Un total de 19 individuos del estudio no han podido ser genotipados por problemas en la preparación de su ADN.

En la Figura 33 se muestra un ejemplo del análisis de polimorfismo A1166C del gen del receptor AT1 en gel de agarosa.

Figura 33. Determinación del polimorfismo A1166C del gen del receptor AT1 mediante digestión enzimática con *BfrI* en gel de agarosa al 2%.



En la Tabla 44 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas halladas en la población de Albacete.

Tabla 44. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo A1166C en población de Albacete.

GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
AA	AC	CC	A	C
196 (49,8)	174 (44,2)	23 (6)	0,72	0,28

En la Tablas 45 y 46 se muestra el análisis por quintiles de PA de las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo, así como su relación con antecedentes familiares de HTA.

Tabla 45. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *A1166C* en los quintiles primero y quinto.

	GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
	AA	AC	CC	A	C
1^{er} QUINTIL N°=192	95 (49,5)	82 (42,7)	15 (7,8)	272 (0,71)	112 (0,29)
5^o QUINTIL N°=201	101 (50,2)	92 (45,8)	8 (4,0)	294 (0,73)	108 (0,27)

$P=0,261$

$P=0,476$

N° = número de individuos; frec= frecuencia

Tabla 46. Distribución de los genotipos del polimorfismo *A1166C* del receptor AT1 según los antecedentes familiares de HTA.

	GENOTIPOS N° (%)		
	AA	AC	CC
Sin historia familiar de HTA N° = 288	140 (48,6)	129 (44,8)	19 (6,6)
Con historia familiar de HTA N°= 105	56 (53,3)	45 (42,9)	4 (3,8)

$P=0,488$

N°= número de individuos

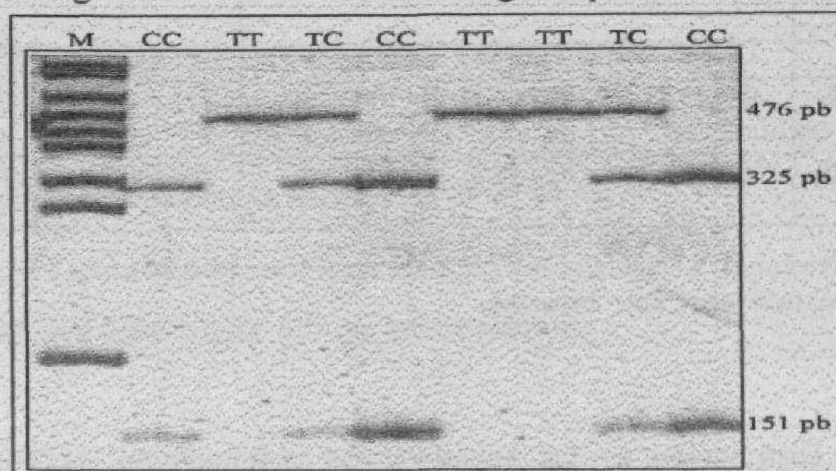
No se encontraron diferencias significativas en la distribución de alelos o genotipos entre los dos quintiles de PA. No se observó asociación entre los antecedentes familiares de HTA y el polimorfismo AT1R 1166.

También se analizaron los tres genotipos del polimorfismo (AA, AC y CC) en relación con el IMC, no observándose asociación ($P>0,05$). El análisis de los genotipos en individuos con edad inferior a 50 años no mostró diferencias entre los dos quintiles (no se muestran los datos) ($P>0,05$).

5.8.2. Polimorfismo C573T del receptor AT1

En la Figura 34 se muestra un ejemplo representativo de la detección del polimorfismo C573T en gel de poliacrilamida al 10%.

Figura 34. Determinación del polimorfismo C573T mediante la digestión con la enzima *MnI* en gel de paa al 10%



En la Tabla 47 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas halladas en la población de Albacete. Se han analizado en este polimorfismo un total de 374 individuos, la pérdida de 28 individuos se ha debido principalmente al deterioro de las muestras de ADN.

Tabla 46. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C573T del gen del receptor AT1 en población de Albacete.

GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
TT	TC	CC	T	C
68 (18)	185 (50)	121 (32)	0,43	0,57

A continuación se exponen los resultados obtenidos al realizar el análisis de la distribución del polimorfismo según quintiles de PA (Tabla 48).

Tabla 48. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo C573T del gen del receptor AT1 en los quintiles primero y quinto.

	GENOTIPOS N° (%)			ALELOS (frec)	
	TT	TC	CC	T	C
1^{er} Quintil N°=182	30 (16,5)	87 (47,8)	65 (35,7)	147 (0,404)	217 (0,596)
5^o Quintil N°=192	38 (19,8)	98 (51,0)	56 (29,2)	174 (0,453)	210 (0,547)

P= 0,368.

P= 0,173

N°= número de individuos. frec= frecuencia .

No se observaron diferencias significativas en la distribución de alelos o genotipos del polimorfismo C573T en los dos grupos analizados en la población.

El análisis de los genotipos y su relación con los antecedentes familiares de HTA no mostró diferencias significativas (Tabla 49).

Tabla 49. Genotipos del polimorfismo T573C del gen AT1R, en relación con antecedentes familiares de HTA.

	GENOTIPOS N° (%)		
	TT	TC	CC
Sin historia familiar de HTA. N° = 278	53 (19,1)	130 (46,8)	95 (34,2)
Con historia familiar de HTA. N°= 96	15 (15,6)	55 (57,3)	26 (27,1)

P= 0,204

N°= número de individuos

Se analizó la asociación de estos genotipos con el IMC (Tabla 50), no obteniéndose diferencias significativas.

Tabla 50. Genotipos del polimorfismo T573C del gen del receptor AT1, en relación con el IMC

GENOTIPOS	IMC media (DE)
TT (N°= 67)	28,1934 (5,3964)
TC (N°= 185)	27,7003 (4,6425)
CC (N°= 121)	27,3468 (4,6106)
POBLACION TOTAL (N°=373)	27,6742 (4,7716)

P> 0,05

IMC= índice de masa corporal; DE= desviación estándar. N°= número de individuos

5.9. ESTUDIO CONJUNTO DE DOS GENES DEL SRA

Se estudió la relación entre genotipos conjuntos de dos polimorfismos de los genes del SRA y la PA. (Tabla 51). No se han estudiado más de dos polimorfismos de forma simultanea debido al tamaño muestral.

Ejemplo del análisis realizado: *M235T* (Agt) y *A1166C* (receptor AT1)

Tabla 51. Frecuencia de combinaciones de los polimorfismos *M235T* del gen Agt y *A1166C* del gen del receptor AT1 en ambos quintiles.

	Genotipos <i>M235T</i> y <i>A1166C</i>								
	Nº (%)								
	TTAA	TTAC	TTCC	MTAA	MTAC	MTCC	MMAA	MMAC	MMCC
1º Quintil	17	20	3	54	38	9	24	23	3
Nº= 191	(42,5)	(60,6)	(100)	(50,5)	(45,8)	(64,3)	(49,0)	(40,4)	(50,0)
5º Quintil	23	13	0	53	45	5	25	34	3
Nº= 201	(57,5)	(39,4)		(49,5)	(54,2)	(35,7)	(51,0)	(59,6)	(50,0)
TOTALES	40	33	3	107	83	14	49	57	6

$P= 0,340$

Nº= número de individuos.

De igual forma al análisis anteriormente expuesto para los polimorfismos 235 Agt y 1166 AT1, se analizaron las combinaciones de los polimorfismos siguientes: I/D (ECA) y 174-235 (Agt); 174-235 (Agt) y 1166 (AT1); 573 (AT1) y 235 (Agt); I/D (ECA) y 573 (AT1); I/D (ECA) y 1166 (AT1); I/D (ECA) y 235 (Agt); 1166 y 573 (AT1).

Ninguna de las combinaciones de dos de los genes analizados mostraron diferencias significativas en su distribución entre ambos quintiles.

5.10. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *REN* Y DEL GEN *NOS* CON HTA

Se investigó la asociación de estos polimorfismos con HTA en dos grupos bien diferenciados. El grupo "Hipertensos", de 75 individuos, estuvo compuesto por 36 individuos procedentes de la consulta de Nefrología del Hospital General de Albacete y 39 individuos hipertensos procedentes del quinto quintil del estudio poblacional; El grupo "Normotensos" estuvo formado por 45 individuos con PA normal procedentes del primer quintil del estudio poblacional. Los cuatro polimorfismos analizados en este subestudio se encuentran en equilibrio de Hardy-Weimber, en todos los casos $P > 0,05$, la comprobación se realizó con el programa GDA (Genetics Data System) (Wen, 1996).

Las características de los dos grupos se muestran en la Tabla 52.

Tabla 52. Medias de edad, PAS, PAD y % de hombres de los grupos analizados.

	Edad (DE)	% ♂	PAS (DE) mmHg	PAD (DE) mmHg
NORMOTENSO Nº= 48	54,37 (15,32)	55	120,61 (21,61)	74,22 (9,14)
HIPERTENSOS Nº= 75	60,36 (10,60)	36	161,91 (21,55)	(85,39) (13,15)
P	0,02	< 0,05	< 0,001	< 0,001

PAS: presión arterial sistólica. PAD: PA diastólica. Nº: número de individuos

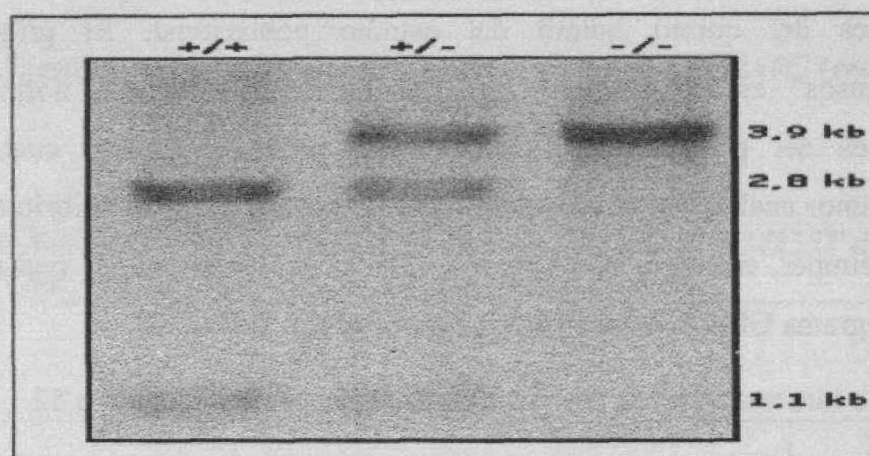
DE: desviación estándar.

Se observa significación estadística entre las edades y la proporción de sexos entre los dos grupos analizados, situación poco favorable pero inherente al diseño realizado, ya que para formar dos grupos bien diferenciados de PA se contaba con pocos individuos del quinto quintil que fuesen hipertensos, tan sólo el 25 %. Esto supone 50 individuos con edades avanzadas y, como se vio en los resultados del análisis poblacional, son las mujeres las que presentan las mayores PA. A esto se une la merma en algunos ADNs debida al análisis de los anteriores polimorfismos.

5.10.1. Polimorfismo *Bgl*I del gen *Ren*

Este polimorfismo consiste en la existencia o ausencia de un sitio de restricción para la enzima *Bgl*I, en el intrón 1 del gen. Si está presente el alelo se denomina (+) si está ausente, (-). En la Figura 35 se muestra un ejemplo del fragmento amplificado y digerido por la enzima mencionada.

Figura 35. Detección del polimorfismo *Bgl*I mediante PCR y análisis de restricción en gel de agarosa al 1%.



Las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *C573T* y su distribución en los dos grupos analizados se muestran en la Tabla 53.

Tabla 53. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *Bgl*I del gen de la renina en los dos grupos de estudio.

	GENOTIPOS N° (%)			ALELOS(%)	
	--	+ -	++	-	+
Hipertensos N°= 69	21 (30,4)	33 (49,0)	15 (22,0)	75 (54,35)	63 (45,65)
Normotensos N°= 44	26 (59,0)	14 (32,0)	4 (9,0)	66 (75,0)	22 (25,0)

Se excluyeron 10 individuos del análisis por dificultades en la clasificación de los alelos al no poder distinguirse con seguridad. Se observa que el genotipo “+ +” es más frecuente en el grupo hipertensos que en el grupo normotensos, lo mismo ocurre con el alelo “+” que es significativamente más frecuente en hipertensos. Estos datos sugieren la existencia de asociación entre el genotipo ++ y la HTA.

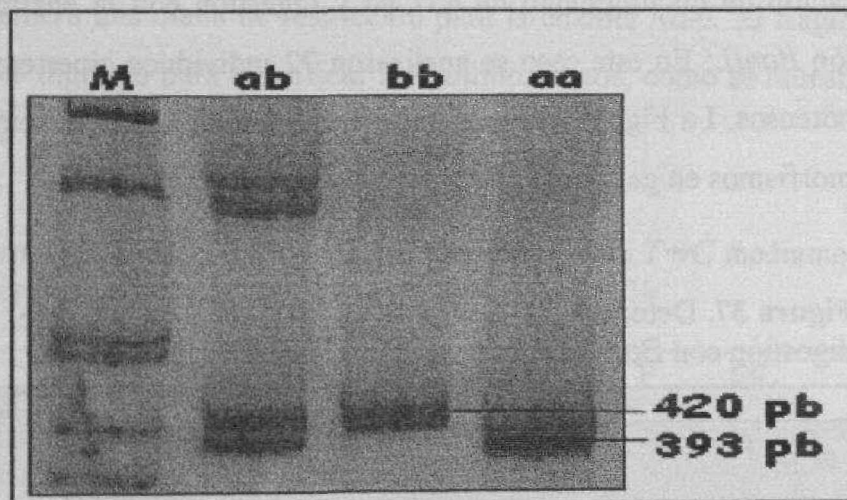
5.10.2. Polimorfismos del gen *Nos*

Se analizaron tres polimorfismos del gen de la ONS, único gen en este estudio que no forma parte del SRA, por la implicación del producto de este gen, el ON, en la regulación de la PA. Se han escogido tres polimorfismos que han mostrado asociación con HTA en otras poblaciones analizadas

5.10.2.1 Polimorfismo *VNTR*

Este polimorfismo consiste en un número variable de repeticiones en tandem que constan de 27 pb y se localiza en el intrón 4 del gen, de tal modo que los polimorfismos se distinguen en función de su tamaño, como se muestra en la Figura 36. El alelo *a* tiene un tamaño de 393 pb (aproximadamente 15 repeticiones en tandem) mientras que el alelo *b* presenta una repetición más, 420 pb, (27 pb mas que *a*)

Figura 36. Detección del polimorfismo *VNTR* del gen *Nos* en gel de paa al 10%



A continuación se exponen las frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo y su distribución en Hipertensos y Normotensos (Tabla 54).

Tabla 54. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo *aVNTRb* del gen *Nos* en los dos grupos de estudio.

	GENOTIPOS VNTR Nº (%)			ALELOS (%)	
	aa	ab	bb	a	b
Hipertensos Nº= 69	1 (1,5)	21 (30,4)	47 (68,0)	23 (16,7)	115 (83,3)
Normotensos Nº= 48	2 (4,2)	15 (31,2)	31 (65,0)	19 (20,0)	77 (80,0)

$P=0,7$.

$P=0,54$

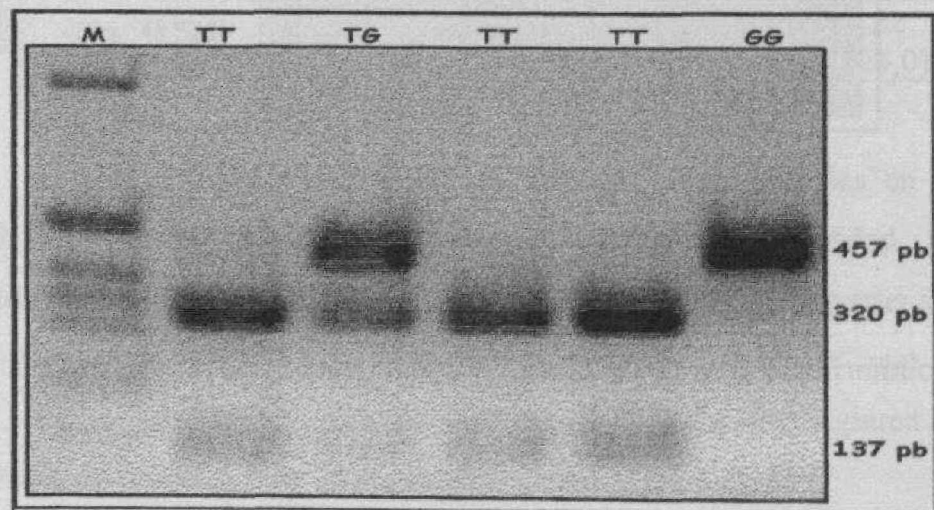
Nº= número de individuos

La Tabla 54 muestra que no hay asociación entre el polimorfismo *aVNTRb* e HTA en la población estudiada.

5.10.2.2. Polimorfismo *Glu298Asp*.

Este polimorfismo se encuentra en el exón 7 del gen y consiste en el cambio de un nucleótido de guanina (G) por otro de timina (T) provocando un cambio en la proteína al producirse la sustitución del aminoácido glutámico por una asparagina. Se detecta mediante la amplificación de un fragmento de 457 pb y digestión con la enzima de restricción *BanII*. En este caso se analizaron 72 individuos hipertensos y 48 normotensos. La Figura 37 muestra un ejemplo de la identificación de los polimorfismos en gel de agarosa.

Figura 37. Detección del polimorfismo *Glu298Asp* mediante digestión con *BanII* en gel de agarosa al 1 %



La Tabla 55 muestra que no existe asociación entre el polimorfismo *Glu298Asp* e HTA en los grupos de hipertensos y normotensos analizados.

Tabla 55. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *Glu298Asp* del gen *Nos* en los dos grupos de estudio.

	GENOTIPOS TG			ALELOS	
	Nº (%)			(%)	
	TT	TG	GG	T	G
Hipertensos Nº= 72	14 (19,0)	33 (46,0)	25 (35,0)	61 (42,4)	83 (57,6)
Normotensos Nº= 48	3 (6,0)	24 (50,0)	21 (44,0)	30 (31,0)	66 (69,0)

$P=0,119$

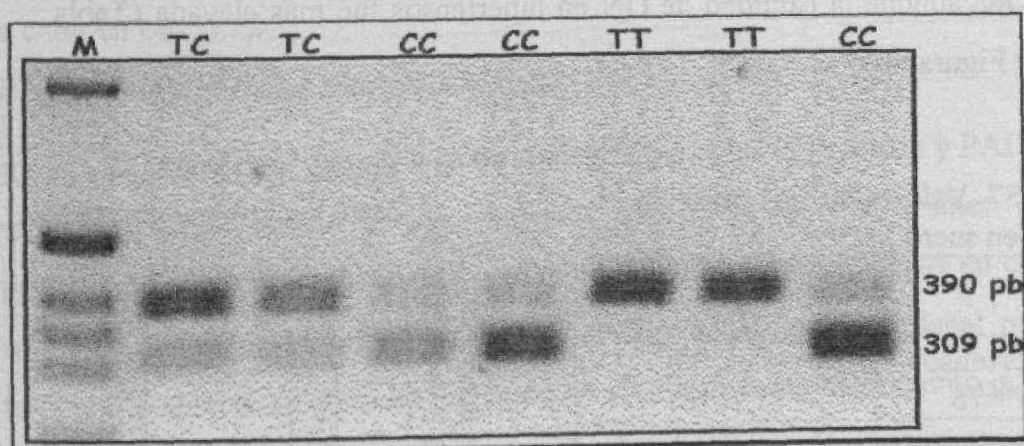
$P=0,082$

Nº= número de individuos

5.10.2.3. Polimorfismo -786 T→C

Esta mutación de la región 5' flanqueante del gen *Nos* consiste en el cambio de una timina (T) por una citosina (C) en la posición -786. Esta mutación genera una diana de restricción para la enzima *NaeI*. El fragmento de 390 pb es digerido para identificar los polimorfismos, como se muestra en la Figura 38.

Figura 38. Determinación del polimorfismo -786 T→C mediante digestión enzimática con *NaeI* en gel de paa al 10%



En la Tabla 56 se muestran las frecuencias alélicas y genotípicas obtenidas en la población de estudio.

Tabla 56. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo -786 T→C del gen de *Nos* en los dos grupos de estudio.

	GENOTIPOS -786 T→C			ALELOS	
	Nº (%)			Nº (%)	
	TT	TC	CC	T	C
Hipertensos Nº= 75	21 (28,0)	38 (50,7)	16 (21,3)	80 (53,3)	70 (46,7)
Normotensos Nº= 48	15 (31,0)	22 (46,0)	11 (23,0)	52 (54,2)	44 (45,8)

$P=0,9$

Nº= número de individuos

$P=0,89$

No se observan diferencias significativas entre los grupos analizados.

5.10.3. Medida del óxido nítrico en suero

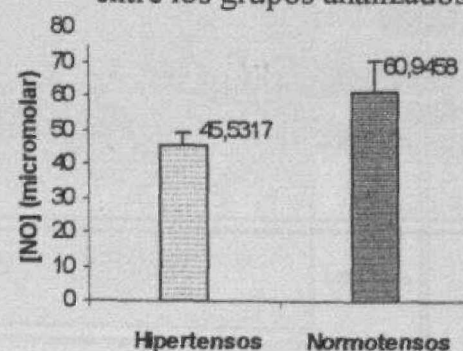
Se consideró interesante medir el óxido nítrico por su implicación en la HTA. Se pretendía comprobar si había asociación entre HTA y los valores de ON en suero de hipertensos y normotensos, ya que se ha descrito que los individuos que padecen hipertensión presentan niveles inferiores de ON. Sin embargo en los grupos analizados no se detectaron diferencias estadísticamente significativas en las concentraciones séricas de ON, (Tabla 57 y Figura 39).

Tabla 57. Valores medios de óxido nítrico en suero

	Media (µM) (DE)
Hipertensos Nº=75	45,5317 (3,7626)
Normotensos Nº=48	60,9458 (9,4154)

$P=0,39$.

Figura 39. Diferencias en ON entre los grupos analizados.



6. DISCUSIÓN

6.1. ESTUDIO POBLACIONAL

Hay que destacar, en primer lugar, que el presente estudio es el único realizado en nuestro país con población general; es decir, en el que no se comparan pacientes hipertensos con individuos normotensos. De este modo tiene mayor validez externa y sus conclusiones son generalizables a otras poblaciones similares a la nuestra. El estudio se centra en el análisis de los factores que afectan a la PA en una población mediterránea general, en particular en la influencia de los genes del SRA y el gen *Nos* y las interacciones entre ellos y con factores tales como la obesidad, los antecedentes familiares de HTA y las relaciones fenotipo-genotipo.

La PA es una variable continua en la que la influencia genética se estima entre el 30 y el 50% (Ward, 1995). Por ello resulta imprescindible conocer los factores ambientales y su interrelación con los genes (hasta el 70 %), así como las interacciones entre los distintos genes implicados, con el fin de dilucidar los mecanismos que determinan los valores de PA en los individuos. Éste ha sido el principal objetivo del presente trabajo, al analizar no solamente las frecuencias de genes implicados en la regulación de la PA, sino su interrelación con algunos factores ambientales que han sido determinados mediante la investigación llevada a cabo en cada individuo, así como sus antecedentes familiares en relación con la PA y las enfermedades cardiovasculares.

En la presente memoria se ha comentado que las PAS media y PAD media mínimas corresponden a las mujeres más jóvenes del primer quintil, probablemente por la influencia positiva de las hormonas femeninas en cuanto a su papel protector en las enfermedades cardiovasculares. Este papel protector también se aprecia en el hecho que tanto en el primer como en el quinto quintil las PAS y PAD medias son mayores en los hombres hasta los 55 años; sin embargo a partir de esa edad (edad de la menopausia en las mujeres) son las mujeres las que

presentan mayores cifras de PA. Las PAS máximas aumentan con la edad en todos los grupos, excepto en hombres mayores de 74 años, lo que podría ser explicado por la mayor mortalidad cardiovascular en este tramo de edad y sexo.

La cardiopatía isquémica, referida en este estudio a infarto de miocardio o angina de pecho, aparece en mayor porcentaje en hombres tanto del quinto quintil (4% en hombres y 2,7% en mujeres) como en el primer quintil (4,7% en hombres y 2,7% en mujeres).

El IMC ha mostrado estar asociado a PA en la muestra analizada. No resulta sorprendente observar que el grupo con mayor IMC e ICC sea el de mayor PA. Los aspectos relacionados con la grasa corporal se han encontrado frecuentemente asociados con la PA (Crews, 1988; Hamet, 1996; Hamet y col., 1998; Crews y Williams 1999), reforzando la idea de la importancia de los factores ambientales (Cooper y col., 1997a). Los datos reflejados en el presente estudio, confirman la alta prevalencia de obesidad y sobrepeso en la población general estudiada. Estos datos de obesidad y sobrepeso sitúan a la población de Albacete entre las provincias con mayor prevalencia del país (Artigao, 1998).

Entre los parámetros bioquímicos analizados, se destaca la gran prevalencia de diabetes en la población estudiada (14,3 %), esta cifra es considerablemente superior a la observada en otras poblaciones españolas (Artigao, 1998). En el presente estudio, existe una mayor prevalencia de diabetes en los individuos del quinto quintil (16,8%) frente a los individuos del primer quintil (11,6 %). Aunque sin diferencias significativas, estos datos concuerdan con la conocida asociación entre HTA y diabetes. Se ha descrito que el 50% de los diabéticos son hipertensos (Drury, 1983; Kannel y col., 1991).

El análisis de los triglicéridos en suero ha mostrado diferencias significativas entre los dos grupos ($P= 0,048$), confirmando que existen asociaciones entre las dislipemias y las enfermedades cardiovasculares (Williams y col. 1988; Schmidt y col., 1996; de Oya, 1998).

Resulta sorprendente que más del 50% de la población analizada ingiera una bebida alcohólica, al menos una vez al día. Aunque no se observan diferencias significativas en el consumo de alcohol entre el primer y quinto quintiles.

6.2. AGREGACIÓN FAMILIAR

En la población del presente estudio se evidencia agregación familiar entre familiares de primer grado, tanto padres como hermanos. También se aprecia que la agregación familiar entre hermanos es superior a la existente entre padres e hijos. Esta observación está presente en la mayoría de estudios realizados sobre agregación familiar (Miall y col., 1967; Ward, 1995). Los hermanos tienden a parecerse más entre ellos que a sus padres (en términos de variación de la PA) y el parecido con sus padres presenta diferencias dependiendo del sexo de los padres y de los hijos. El estudio *Tokelau* llevado a cabo en familias polinesias (Beaglehole y col., 1975), demostró que la influencia conjunta de los genes y el ambiente "actúa" temprano en la infancia, alrededor de la edad de 5 años, produciendo una agregación familiar de la PA que permanece estable el resto de la vida. Con estos datos se puede entender porqué entre hermanos, que comparten un ambiente homogéneo en su infancia, la agregación familiar es superior a la que puede observarse con sus padres. Los padres se vieron influidos en su infancia por el ambiente existente en sus hogares, que es distinto al del nuevo hogar que comparten. La baja correlación existente entre esposos al estudiar los valores de PA (Ward, 1995), indica que los factores ambientales en el hogar actual ejercen una influencia mínima en la variación de la PA una vez se ha alcanzado la edad adulta. Esto lo demuestra el hecho de que los hermanos ya adultos, viviendo separados, siguen presentando similares valores de PA, y que una pareja que comparte el mismo hogar, no presente similitudes apreciables en sus valores de PA.

Es incuestionable que la agregación familiar de la PA está presente de forma consistente en la mayoría de las poblaciones evaluadas. También se ha demostrado que la heredabilidad genética supone aproximadamente el 30% de la variabilidad poblacional, mientras que la distribución de factores socioculturales supone un 20%. Con relación a la cuestión planteada por Ward (1995) sobre lo que es más importante "*nature or nurture*" (naturaleza o crianza), hay evidencias claras que demuestran que los factores genéticos son principalmente responsables de la agregación familiar observada en las poblaciones. Se estima que aproximadamente entre el 60 y el 70% de la agregación familiar es, en última

instancia, debida al fondo genético; siendo la transmisión familiar de factores culturales responsables del resto.

En este contexto se encuadra el objetivo central del presente proyecto, analizar el efecto de polimorfismos de los genes del SRA y *Nos* en la PA.

6.3. ANGIOTENSINÓGENO Y PRESIÓN ARTERIAL

La síntesis de angiotensinógeno constituye el primer paso en la cascada del sistema renina-angiotensina (Figura 7). Bajo condiciones fisiológicas normales el AGT circula en sangre en concentraciones de 0,6 $\mu\text{mol/L}$, inferior a la K_m de la renina (1 $\mu\text{mol/L}$) y es por tanto limitante para la velocidad máxima de formación de angiotensina I (Reid y col., 1978). De este modo se puede entender que los cambios en la concentración de AGT tengan influencia en la actividad del SRA. Este hecho convirtió al gen del AGT en un candidato muy atractivo para ser analizado en estudios de asociación de genes e hipertensión.

En 1992, un estudio pionero realizado por Jeunemaitre y col. (1992a) encontró una asociación entre el alelo 235T del gen del AGT y la HTA en dos poblaciones caucásicas, al tiempo que se detectaba un incremento en la concentración de AGT plasmático (entre el 10 y el 40 %), en los individuos que presentaban este alelo. Además del polimorfismo M235T, estos investigadores hallaron asociación entre hipertensión y otro polimorfismo cercano al anterior, el T174M, siendo la variante 174M la que se asociaba a HTA. Desde entonces han sido muy numerosos los estudios realizados, encontrándose en la mayoría de ellos asociación entre la variante 235T y niveles altos de PA (Hata y col., 1994; Kamitani y col., 1994; Jeunemaitre y col., 1992a, 1993, 1997; Johnson y col., 1996; Krizanová y col., 1997). Sin embargo, en otros estudios realizados en diferentes poblaciones no se ha encontrado dicha asociación (Bennett y col., 1993; Barley y col., 1994b; Rotimi y col., 1994; Fornage y col., 1995; Tiret y col., 1995; Fernández Llamas, 1996; Doria y col., 1996; Hingorani y col., 1996; Brand y col., 1998; Fernández Llama y col., 1999; Pamies-Andreu y col., 1999). Son escasos

los estudios que han encontrado alguna asociación entre el polimorfismo *T174M* y niveles elevados de PA (Hegele y col., 1994; Christiakov y col., 1999).

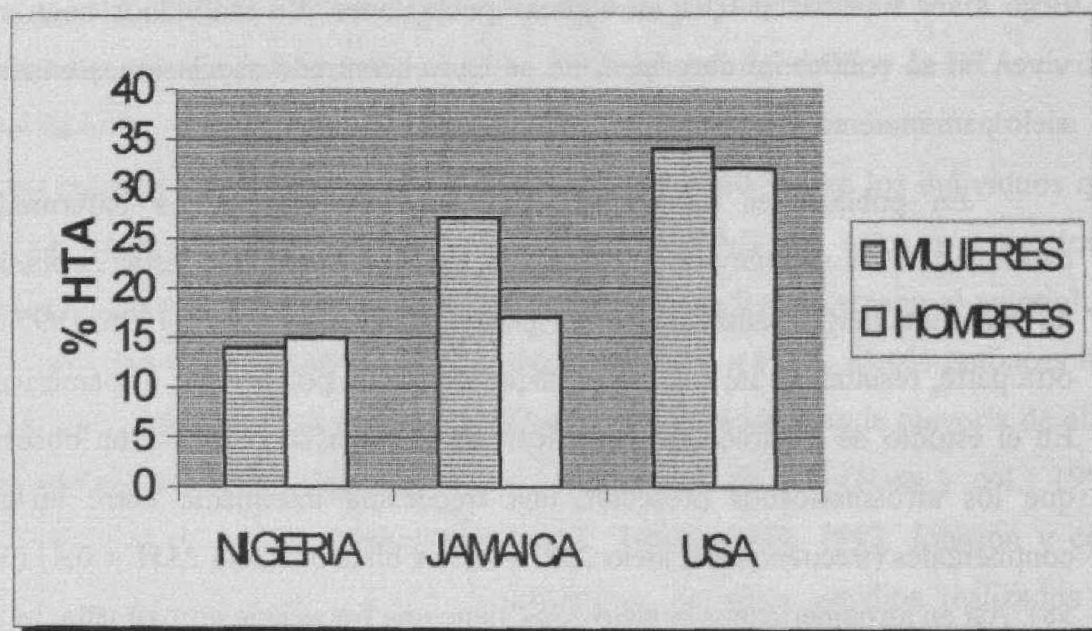
De entre los innumerables estudios que se han publicado en diferentes poblaciones relativos al polimorfismo *M235T* del AGT, es importante mencionar dos meta-análisis, tanto por su elevado número de pacientes como por su análisis de resultados. Tales estudios han tenido en cuenta factores como etnia, diseño experimental, características clínicas de los pacientes, edad, sexo y fiabilidad de los datos incluidos en ellos. En ambos meta-análisis se concluye que en caucasianos existe una débil pero significativa asociación entre el alelo *235T* y la HTA. Kunz y col (1997) encontraron asociado el alelo *235T* con la HTA en un estudio realizado con 5.493 pacientes blancos, en los que dicha asociación se incrementa cuando se tienen en cuenta los antecedentes familiares de hipertensión. En el meta-análisis realizado por Staessen y col. (1999), el más extenso llevado a cabo hasta el momento, se analizaron 69 estudios casos-control con más de 27.000 individuos. Concluyó que en individuos caucasianos el alelo *235T* está asociado con el aumento del riesgo de padecer hipertensión. No ocurre así en africanos, ya que presentan una frecuencia muy elevada del alelo *235T*, que llega a ser superior al 0,91 en algunas poblaciones. En individuos negros que viven en su continente de origen, no se han encontrado asociaciones entre este alelo y un incremento de la PA.

En poblaciones de Africa occidental la HTA y las enfermedades cardiovasculares son muy poco frecuentes. Se ha observado en estas poblaciones africanas una mayor cantidad de AGT plasmático (Rotimi y col., 1996, 1997). Por otra parte, resultan de interés los análisis referidos a poblaciones afroamericanas. En el estudio de las frecuencias alélicas del polimorfismo 235 se ha observado que los afroamericanos presentan una frecuencia intermedia entre africanos continentales (frecuencia del alelo *235T* \approx 0,9) y blancos (alelo *235T* \approx 0,4) (Tabla 58). Así en afroamericanos el alelo *235T* tiene una frecuencia aproximada de 0,83. La frecuencia de los alelos del 235 en jamaicanos y poblaciones afrocaribeñas es muy similar a los afroamericanos de EE.UU. Debido a que afroamericanos y jamaicanos son descendientes principalmente de africanos occidentales y comparten un origen común (Adams y Ward, 1973; Chakraborty y col., 1992; Cooper y Rotimi, 1994), la disminución en la frecuencia de el alelo *235T* en estas

poblaciones en relación a los nigerianos refleja, presumiblemente, la consecuencia de la mezcla con europeos, estimada en torno al 25% en individuos negros de EE.UU. (Adams y Ward, 1973). En estos grupos la presencia del alelo *T* apenas confiere susceptibilidad a un aumento de PA en sus lugares originarios (Forrester y col., 1996). Sin embargo estos grupos afroamericanos presentan una prevalencia muy alta de HTA y enfermedades cardiovasculares, lo que demuestra que, en un entorno distinto (dieta, estrés), un alelo que predispone a la elevación de la PA (235T) confiere una sensibilidad elevada al padecimiento de HTA.

Dada la variación en las tasas de hipertensión entre África, Caribe y EE.UU. (Figura 40), cualquier susceptibilidad conferida por esta (u otra) variante molecular se expresa en contextos medioambientales muy diferentes, lo que confirma el concepto de que los factores genéticos tienen influencia principalmente en el rango de individuos dentro de una población, y que el riesgo conjunto en la sociedad determina la tasa de prevalencia.

Figura 40. Prevalencia, ajustada por la edad, de la hipertensión por sexos entre individuos de origen africano-occidental.



En población japonesa, un primer trabajo reveló una alta frecuencia del alelo 235T y su asociación con hipertensión esencial (Hata y col., 1994). Otros estudios corroboraron esta asociación (Kamitani y col., 1994; Nishuima y col., 1995). Sin embargo, un reciente meta-análisis (Kato y col., 1999) encontró una gran heterogeneidad en cuanto a las frecuencias alélicas del polimorfismo M235T entre los sujetos controles, pero no permitió asociar al alelo 235T con mayores niveles de PA. Es destacable que en la población japonesa general, el alelo 235T presenta una alta frecuencia (alrededor de 0,77).

Otra población asiática, la población china, presenta aún más elevada la frecuencia del alelo 235T, alcanzando un 0,8. Éste es el argumento que esgrimen Niu y col. (1999) para explicar porqué no han encontrado en población china una asociación entre el alelo 235T y la HTA. Por lo general, la población china no presenta una alta prevalencia de hipertensión, por lo que es difícil atribuir un papel negativo a un alelo que es tan frecuente en esa población (Thomas y col., 2000).

Los estudios que se han realizado estos últimos años en distintas poblaciones de todo el mundo, han hecho cambiar la idea que a principios de los años 90 existía sobre el alelo denominado "salvaje". Se pensó que el alelo ancestral era el 235M y el alelo T correspondía al mutado (Rutledge y col., 1994). Recientemente se ha podido demostrar, que el alelo ancestral es el alelo 235T, siendo el M234 el alelo neomórfico (Inoue y col., 1997; Jeunemaitre y col., 1997).

En el presente estudio hemos encontrado unas frecuencias alélicas similares a otras poblaciones caucásicas europeas (Rotimi y col., 1996), como se muestra en la Tabla 58.

Tabla 58. Frecuencias alélicas de las variantes *T174M* y *M235T* del gen *Agt* según etnia y país.

GRUPO ÉTNICO/PAÍS	<i>T174M</i> ALELOS %		<i>M235T</i> ALELOS %	
	T	M	M	T
Afroamericanos (USA)	95	5	13	87
Americanos caucasianos (Canadá)	82	18	59	41
Americanos caucasianos (USA)	90	10	62	38
Europeos caucasianos (Francia)	87	13	55	45
Población de Albacete	87	13	55	45
Europeos caucasianos (Inglaterra)	90	10	50	50
Caucasianos de Oceanía (Australia)	sin datos	sin datos	59	41
Japoneses (Japón)	sin datos	sin datos	17	83
Africanos (Nigeria)	93	7	9	91

En una reciente revisión Wang y Staessen (2000), obtienen datos que difieren en alguna medida de los comentados anteriormente. Estos autores determinan que la frecuencia del alelo *235T* en caucasianos oscila entre el 42,2% y el 52,1%; en africanos es del 77%; y en asiáticos del 78%. De modo que la prevalencia del alelo T es dependiente del grupo étnico ($P=0,001$).

Los datos obtenidos en la población de Albacete son concordantes con poblaciones caucásicas europeas y se asemejan a otras poblaciones españolas (Fernández-Llama y col., 1999; Pamies-Andreu y col., 1999), si bien existen algunas diferencias con una población del noreste de España (Giner y col., 2000), en la que las frecuencias alélicas son del 35,5% para el alelo *235T* y del 64,5% para el *M235*. Estas diferencias se podrían deber a que en esta población el análisis se realizó únicamente con individuos hipertensos.

Se pretendía analizar la asociación de los polimorfismos *T174M* y *M235T* entre los dos grupos de mayor y menor PA (primer y quinto quintiles) del presente

estudio, sin embargo no se observaron diferencias significativas para ninguna de las dos variantes, ni en alelos ni en genotipos. Estos datos concuerdan con las poblaciones españolas peninsulares anteriormente citadas y con una población canaria (Rodríguez-Pérez y col., 2000), en las que tampoco encuentran relación entre el polimorfismo *M235T* y los niveles de PA.

Muy recientemente se ha constituido en España el denominado *Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial*, formado por cinco equipos de investigadores de diferentes provincias (Albacete, Barcelona, Las Palmas, Sevilla y Valencia). El principal propósito es el análisis conjunto de los resultados de cada equipo, para obtener un mejor conocimiento de la influencia de los genes sobre la PA en un entorno bastante homogéneo como es España. Hasta el momento se ha analizado el polimorfismo *M235T* del gen *Agt* y el gen de la ECA. Los resultados obtenidos en el polimorfismo *M235T* para el conjunto de la población española analizada concuerdan exactamente con los obtenidos en nuestra población. No se observa asociación entre el polimorfismo *M235T* y los niveles de PA en el conjunto de poblaciones analizadas, con 1.204 individuos que integran el grupo de mayor PA (casos) y 647 que componen el grupo de menor PA (controles). También es destacable que las frecuencias alélicas del polimorfismo *M235T* son similares a las obtenidas en nuestro estudio (frecuencia del alelo *T* =0,46; en la población de Albacete la frecuencia es 0,45). Los resultados han sido enviados para su publicación en la revista *Medicina Clínica (Barcelona)* (Poch y col., 2001) (Anexo 5).

La edad es un potente modulador de la HTA, como se aprecia en el presente estudio, en el que las mayores cifras de PA aparecen significativamente unidas a una edad más avanzada. Para minimizar este efecto, y observar el efecto genético de forma más directa, se realizó un análisis de nuestros genotipos en individuos con una edad inferior a los 50 años. Sin embargo no se obtuvieron resultados diferentes a los observados en el estudio completo.

Es importante resaltar dos estudios realizados en población normotensa. En el primero de ellos Schorr y col. (1999) hallaron asociación significativa entre el genotipo *T235T* y antecedentes familiares de HTA, de modo similar a los resultados que aquí se presentan, en el que se observa asociación significativa entre el genotipo conjunto *T235T-T174T* e historia familiar de HTA. En el

segundo estudio Paillard y col. (1999) realizaron el análisis del polimorfismo *M235T* en una población normal europea caucasiana, no encontrando asociación entre ninguna de las variantes y la PA.

En numerosos estudios se ha relacionado la cantidad de AGT plasmático y el polimorfismo *M235T* con el IMC (Tamura y col., 1994; Forrester y col., 1996; Umemura y col., 1997; Cooper y col., 1997a, 1998; Rankinen y col., 1999). Niveles más altos de AGT en plasma se relacionan con mayor cantidad de tejido adiposo. Esto se ha comprobado también en ratas obesas en las que la existencia de un tipo de HTA estaba ligada a obesidad, así como a una regulación de la expresión del gen AGT específica de tejido adiposo (Tamura y col., 1997). Se ha demostrado en ratas en ayuno que el AGT liberado por el tejido adiposo decrecía en este estado para aumentar al interrumpir el mismo. Este aumento se derivaba del tejido adiposo local, ya que el ARNm del hígado no se afectaba por el ayuno o la sobrealimentación (Frederich y col., 1992).

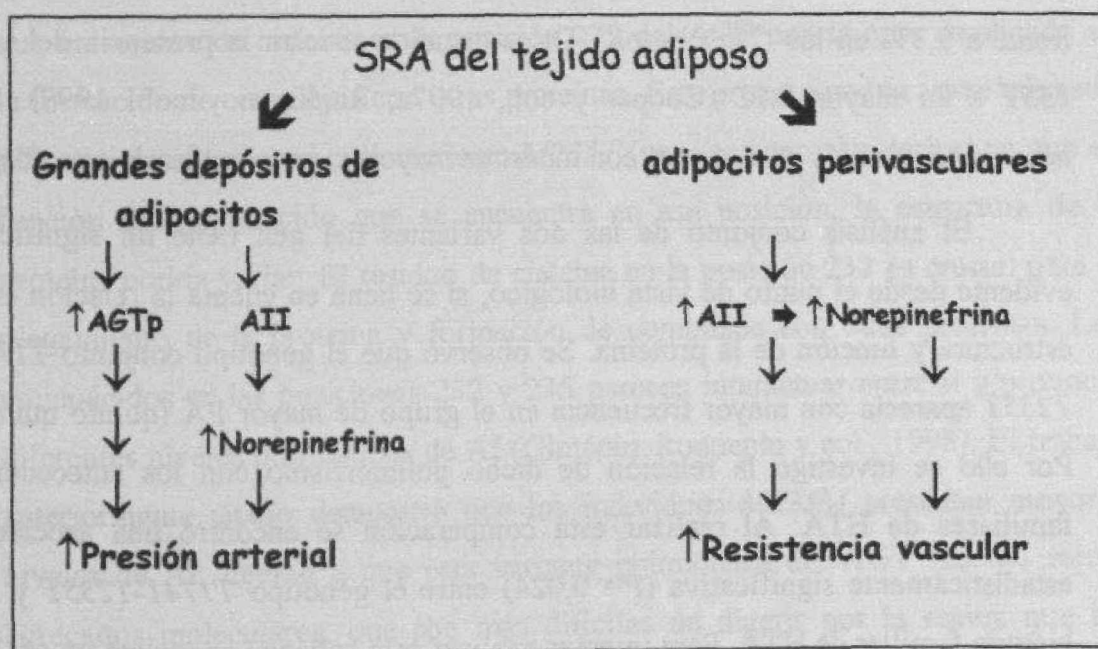
El gen *Agt* se expresa en adipocitos y su expresión ha mostrado estar relacionada con la PA durante la pérdida y ganancia de peso, procesos en los que se han visto influenciados los niveles de AGT (Eggena y col., 1991; Cassis y col., 1998). Se ha encontrado una correlación positiva entre las concentraciones de AGT plasmático y la grasa corporal y, aunque el mecanismo que relaciona estas dos variables permanece desconocido, una posible explicación podría encontrarse al considerar el tejido adiposo como fuente de AGT plasmático, ya que, después del hígado, el tejido adiposo produce la mayor cantidad de AGT en humanos (Ishigami y col., 1999; Van Harmelen y col., 2000). La relación entre el peso corporal, la HTA y la expresión en tejido adiposo de los genes del SRA en humanos, sugiere una correlación positiva entre la producción de AGT en tejido adiposo visceral ó subcutáneo y el IMC y/o el índice cintura/cadera (ó únicamente cintura), reflejo de obesidad abdominal. No se han observado diferencias significativas en la expresión del gen de la ECA o del gen del receptor AT1 en tejido adiposo entre individuos delgados u obesos (Engeli y Sharma, 2000).

La AII incrementa la expresión del gen de la leptina y la formación de prostaciclina en adipocitos maduros, e induce la secreción de norepinefrina en tejido adiposo marrón (Engeli y Sharma, 2000), mecanismo que puede estar relacionado con la regulación de la PA. Los receptores AT1 median, de forma

aparente, la modulación del recambio de norepinefrina por la AII derivada de tejido adiposo. Este mecanismo influye en la reacción vascular, lo que se demostró utilizando antagonistas del receptor AT1 y comprobando que ese mecanismo reactivo se inhibía (Engeli y Sharma, 2000).

La Figura 41 representa la regulación cardiovascular del AGT y de la AII derivados de tejido adiposo. La secreción de AGT por el tejido adiposo puede incrementar los niveles plasmáticos de AGT (AGTp), como se sabe ligado a un aumento de PA. La AII formada en el tejido adiposo puede incrementar, no sólo el tono vascular, sino también la secreción de norepinefrina de las neuronas del sistema simpático. Cuando se consideran especialmente los adipocitos perivasculares, la formación de estos dos vasoconstrictores, AII y norepinefrina, puede contribuir a un aumento de la resistencia vascular. El mecanismo descrito parece ser importante para la obesidad asociada a hipertensión así como para la regulación de la expresión de AGT que se ha reportado en individuos obesos.

Figura 41. Regulación de la PA por el AGT y la AII derivados de tejido adiposo.



Se ha podido demostrar la asociación del polimorfismo *M235T*, concretamente de la variante *235T*, con los niveles de AGT en plasma (Jeunemaitre y col., 1992a; Ward y col., 1993; Bloem y col., 1995; Rotimi y col., 1997; Danser y col., 1998). La explicación podría encontrarse en el desequilibrio

de ligamiento que presenta esta variable con un polimorfismo en el promotor del gen *Agt*, que estaría relacionado con una mayor tasa de transcripción y por lo tanto podría dar lugar a una elevación de la concentración de la proteína.

El presente trabajo no se ha podido analizar el AGT plasmático, ya que no se disponía de la tecnología para realizar análisis con isótopos radiactivos, la única forma conocida de detección del AGT. Sin embargo, se han comparado los polimorfismos del AGT con el IMC obteniendo los resultados que se discuten a continuación.

Se observa un mayor IMC en individuos portadores del alelo *174T*. De los tres posibles genotipos el *M174M* presentaba menor IMC, seguido del *T174M* y, por último, el *T174T*. Éste último se asociaba a mayor IMC, aunque sin diferencias significativas. Este resultado no se ha observado en otras poblaciones.

En cuanto al polimorfismo 235 no se observa la tendencia vista en el 174. Sin embargo, al comparar el genotipo conjunto de ambos polimorfismos del AGT con las categorías "Obeso" y "No Obeso", se obtiene una marcada tendencia en el grupo "Obesos" en los que el genotipo *T174T-T235T* es más frecuente: 12,7% frente a 9,3% en los "No obesos". Otros estudios asocian la presencia del alelo *235T* a un mayor IMC (Cooper y col., 1997a; Rankinen y col., 1999). Son necesarios estudios posteriores, con muestras mayores, para confirmar estos datos.

El análisis conjunto de las dos variantes del gen tiene un significado evidente desde el punto de vista biológico, si se tiene en cuenta la relación entre estructura y función de la proteína. Se observó que el genotipo conjunto *T174T-T235T* aparecía con mayor frecuencia en el grupo de mayor PA (quinto quintil). Por ello se investigó la relación de dicho polimorfismo con los antecedentes familiares de HTA. Al realizar esta comparación se encontró una asociación estadísticamente significativa ($P=0,024$) entre el genotipo *T174T-T235T* y una historia familiar de HTA. Para intentar explicar este hallazgo se realizó un análisis de la estructura secundaria de estas variantes de la proteína. El AGT está formado por 452 aminoácidos. La secuencia de la angiotensina II (AII) se localiza en su porción N-terminal (Gailard y col., 1989). La comparación de la predicción de la estructura secundaria del polipéptido AGT con las variantes de los polimorfismos 174 y 235, muestra que la región que contiene el aminoácido en la posición 174

incrementa la proporción de la conformación en hoja plegada beta (β), si se encuentra una treonina (T) en esa posición. En el caso de la posición 235, la presencia de una treonina (T), también favorece la aparición de una región en hoja plegada β , inexistente si en ese lugar hay una metionina. Este cambio conformacional está representado en la Figura 31.

El análisis realizado sugiere que el cambio en la conformación de la proteína AGT (452 aminoácidos), podría influenciar la eficacia de la digestión del polipéptido por la renina para producir el decapeptido angiotensina I (AI). No se conoce función alguna para los 442 aminoácidos remanentes que forman el AGT (Garbers y Dubois, 1999). Es posible que la estructura secundaria tenga influencia en la unión de la molécula a la renina, paso previo a la digestión y por tanto ello podría influir en los niveles plasmáticos de AI. Esta hipótesis se ve apoyada por una fuerte asociación entre la variante *235T* y los niveles plasmáticos de AI.

Cohen y col. (1996) han sugerido que la variante *235T* condiciona una modificación conformacional en la molécula del AGT, suficiente como para ser detectada por anticuerpos monoclonales específicos. Asimismo, se ha demostrado que un residuo de cisteína en la posición 232 del AGT podría estar implicado en la formación de complejos con otras proteínas. Este proceso podría verse afectado diferencialmente por el polimorfismo *M235T* (muy cercano al anterior) ya que en función del aminoácido que se encuentra en esa posición, la estructura de la proteína podría variar. El residuo de cisteína en la posición 232 es crucial para el plegamiento de la proteína y formación de complejos con otras proteínas. Los aminoácidos en las posiciones 232 y 235 parecen interactuar entre sí y provocar diferentes niveles plasmáticos de AI (Giménez-Roqueplo y col., 1998). El trabajo anteriormente citado demuestra que los individuos *M235M* presentan menores niveles de AI, debido a que esta variante polimórfica del AGT (*235M*) forma agregados moleculares, que son más difíciles de digerir por la renina que las moléculas de AGT de los individuos *T235T*. Al no formar dichos complejos, las moléculas de AGT son rápidamente digeridas por la renina y por consiguiente producen mayores niveles de AI. De este modo se confirma que el polimorfismo *M235T* modifica la estructura y la función del AGT, y no sería necesariamente un marcador ligado a otra mutación en el promotor, lo que también explicaría su asociación con mayores niveles de AII en plasma o con niveles superiores de PA.

Algo similar podría ocurrir con los polimorfismos que afectan a las dos posiciones estudiadas, 174 y 235, y el cambio conformacional que proponemos en nuestra hipótesis. La asociación entre el genotipo *T174T-T235T* y antecedentes familiares de HTA, sugiere que este genotipo podría representar un factor de predisposición para desarrollar valores más elevados de PA en la población objeto de estudio.

Del mismo modo, la presencia de una metionina en la posición 174 en el genotipo *T174M-T235T* es más frecuente en individuos que no presentan historia familiar de HTA, aunque sin ser esta diferencia estadísticamente significativa ($P=0,05072$). Este genotipo podría considerarse, en esta población y de confirmarse la asociación, como un factor protector frente a la enfermedad hipertensiva. Sería necesario aumentar el tamaño de la muestra estudiada para aclarar este aspecto.

Transcurridos ya diez años del inicio del estudio, sería de sumo interés conocer la evolución de los individuos portadores del genotipo *TTTT* y con antecedentes familiares de HTA. Ello permitiría averiguar si han desarrollado HTA en una proporción significativamente más elevada que el resto de individuos con una historia familiar de HTA y otros genotipos. Se podría así validar el mencionado genotipo como un marcador del riesgo de padecer enfermedad hipertensiva en nuestra población. Se proyecta evaluar este aspecto en una continuación ulterior del presente estudio.

El hecho de que en esta población haya tres genotipos conjuntos que no han aparecido de los nueve posibles (*M174M-M235M*; *T174M-M235M*; *M174M-M235T*), podría ser debido a un número insuficiente de individuos estudiados. Sin embargo, lo más probable es que ello se deba a un posible desequilibrio de ligamiento existente entre los dos polimorfismos (Jeunemaitre y col., 1992a; Hegele y col., 1994). Estos dos *loci* polimórficos se encuentran muy próximos en la cadena de ADN del gen, ambos en el exón 2. El polimorfismo *T174M* ocurre en la posición +521, mientras que el polimorfismo *M235T* ocurre en la posición +704.

En la literatura no existe ningún análisis similar al aquí presentado en cuanto a la ausencia de los mencionados genotipos. Al comparar estos datos con los resultados de la población valenciana estudiada por el grupo del Instituto de

Investigaciones Citológicas de Valencia, se ha constatado que en su población tampoco existen esos tres genotipos conjuntos (comunicación personal).

6.4. ENZIMA CONVERTIDORA DE LA ANGIOTENSINA Y PRESIÓN ARTERIAL

La ECA junto con la renina es una de las dos principales enzimas del SRA. La ECA convierte el decapeptido angiotensina I (AI) en el octapéptido angiotensina II (AII), y es la AII la que media la señal celular a través de sus receptores. La generación de este octapéptido activo, la AII, a partir del inactivo AI y la inactivación de la bradiquinina (otra actividad de la ECA) que es vasodilatadora, refuerza el papel de la ECA en el tono vascular, como lo demuestra la eficacia de los inhibidores de la misma en el tratamiento de la HTA. Ello justifica que se hayan realizado numerosos esfuerzos para dilucidar la relación del gen que codifica este enzima con la PA.

El interés por el polimorfismo *I/D* de la ECA se inició con la observación de que éste estaba implicado la variación de la concentración de la enzima en el plasma (Rigat y col., 1990). Dos años más tarde, Cambien y col. (1992) lo relacionaban con el infarto. El incremento en la expresión del gen y la actividad de la ECA en el miocardio demostraron estimular la tasa local de producción de AII en la rata (Schunkert y col., 1990).

Si se asume que la relación entre el polimorfismo *I/D* y las concentraciones de ECA sérica pueden ser extrapoladas al miocardio y arterias coronarias, sería lógico esperar una alta concentración de AII en el corazón y vías coronarias de los individuos con el genotipo *D/D*. Es de esperar una asociación entre el alelo *D* y el infarto de miocardio, ya que la AII promueve la proliferación de las células del músculo liso vascular, la migración de éstas dentro de la capa íntima de las arterias, y la síntesis de matriz extracelular, procesos que dan lugar a arteriosclerosis y obliteración de arterias. Del mismo modo, la posible relación fisiopatológica entre el polimorfismo *I/D* y la arteriosclerosis fue la razón para buscar una asociación entre el alelo *D* y el infarto cerebral junta a algunas

enfermedades renovasculares. En muchos de estos estudios se encontró tal asociación (Cambien y col., 1992 y 1994; Raynolds y col., 1993; Tired y col., 1993, 1998; Iwai y col., 1994; Nakai y col., 1994; Schunkert y col., 1994; Mattu y col., 1995; Samani y col., 1996; Staessen, y col. 1997). Asimismo, el alelo *D* se ha encontrado asociado a microalbuminuria y daño renal en hipertensión esencial (Fernández Llama, 1996; Redón y col., 2000)

Entre los estudios que, por el contrario, no encontraron asociación del polimorfismo *I/D* de la ECA con enfermedades cardíacas, cabe destacar el realizado por Lindpaintner y col (1995) sobre 1.250 individuos que habían padecido angina, enfermedad isquémica o infarto de miocardio, frente a 1.250 controles. En este trabajo se concluye que el alelo *D* del gen de la ECA no confiere un incremento apreciable del riesgo de padecer enfermedad isquémica. Otro reciente meta-análisis de Keavney y col. (2000), realizado con 5.000 casos y 6.000 controles, el más extenso hasta la fecha, concluye que no existe asociación entre el genotipo *D/D* e infarto de miocardio, y propone poblaciones de estudio de más de 10.000 casos y 10.000 controles para obtener resultados esclarecedores.

En población española hay que destacar el trabajo de Gómez-Angelats y col. (2000) en el que estudian la relación entre hipertrofia ventricular izquierda en pacientes con hipertensión esencial y el polimorfismo *I/D*, no encontrando asociación.

Debido a que en el presente estudio el número de individuos afectados por infarto de miocardio o angina de pecho es muy reducido, no se ha podido demostrar su relación con el polimorfismo *I/D*. Cabe mencionar que hemos encontrado una mayor proporción de individuos con el genotipo *D/D* que habían sufrido infarto de miocardio (38,5 %) frente a los que no habían padecido esa patología (34,1%). En un próximo proyecto de nuestro grupo se pretende averiguar si, transcurridos 10 años, los individuos portadores del genotipo *D/D* han sufrido en mayor proporción un evento cardiovascular, lo que permitiría determinar si este genotipo puede ser utilizado como un marcador de riesgo en la población de Albacete.

Aunque no hay evidencia ni fisiológica ni clínica de relación entre la cantidad de ECA en plasma y la PA, se ha buscado exhaustivamente una posible

asociación entre la HTA esencial y la ECA, tanto en términos de actividad enzimática como de presencia de un determinado genotipo. Por ello los estudios realizados durante los últimos diez años para determinar dichas asociaciones han obtenido resultados negativos (Jeunemaitre y col., 1992c, Harrap y col., 1993; Kamdar y col., 1994; Fernández Llama, 1996; Popov y col., 1996; Schmidt y col., 1997; Chiang y col., 1997b; Staessen y col., 1997). Sin embargo, también han aparecido otros trabajos en los que sí se ha hallado una asociación entre el alelo *D* y la HTA, especialmente en población afroamericana (Zee y col., 1992; Higashimori y col., 1993; Morise y col., 1994b; Duru y col., 1994; Barley y col., 1996; Mastana y Nunn, 1997).

En la población de Albacete, el análisis por quintiles no muestra diferencias en las medias de enzima.

Al igual que en el gen del AGT, es importante en este caso tener en cuenta las diferencias que existen en las frecuencias alélicas en las distintas etnias. Un estudio realizado por Barley y col. (1994a) en el que analizan la distribución de los tres genotipos *I/I*, *I/D* y *D/D*, comparando población negra nigeriana con población caucasiana europea, detecta pocas diferencias en la distribución de los genotipos. Sin embargo en las etnias samoanos (Polinesia) y yanomami (Sudamérica) las frecuencias son muy diferentes. En estos dos últimos grupos la frecuencia del genotipo *D/D* es de alrededor del 2%, la más baja encontrada en ninguna otra población analizada (Tabla 58). En las dos poblaciones la tasa de enfermedades cardíacas es muy baja, y se ha observado que no existe incremento de la PA con la edad.

Rotimi y col. (1996) analizaron las distintas frecuencias de alelos y genotipos del gen de la ECA en diferentes grupos étnicos. En la Tabla 59 se exponen estas frecuencias incluyendo las de la población objeto de este estudio.

Tabla 59. Frecuencias genotípicas y alélicas del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA en diferentes grupos étnicos.

	GENOTIPOS %			ALELOS %	
	DD	ID	II	D	I
*Europeos (Franceses)	32	49	19	57	43
Población de Albacete	35	51	14	60	40
*Europeos (Ingleses)	27	48	25	51	49
*Africanos (Nigeria)	35	49	16	60	40
*Afro-americanos	34	48	18	58	42
*Afro-caribeños	46	36	18	64	36
**Chinos (Hong Kong)	14	53	33	41	59
*Japoneses	19	38	43	38	62

* Rotimi y col., 19996; **Thomas y col., 2000.

En población de Albacete no se observa asociación significativa entre alelos o genotipos y mayores niveles de PA. Estos resultados concuerdan con la mayor parte de los estudios en poblaciones caucasianas europeas y así como con los de otras dos poblaciones españolas de Barcelona y Sevilla (Fernández de la Llama y col., 1999; Pamies-Andreu y col., 1999). En el estudio mencionado con anterioridad del *Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial* (Poch y col. 2001) (Anexo 5), que engloba los resultados de cinco poblaciones españolas (Albacete, Barcelona, Las Palmas, Sevilla y Valencia), no se observan diferencias significativas entre genotipos del gen ECA y la PA. Las frecuencias de este estudio multicéntrico en población española son muy similares a las que aquí se presentan (frecuencia del alelo D= 0,62). En la población de Albacete tampoco se ha hallado asociación al analizar individuos de edad inferior a 50 años, selección realizada con el fin de obviar los efectos de la edad.

O'Donnell y col (1998) postularon que el alelo *D* tiene influencia sobre la PA únicamente en hombres, dentro del *Framingham Heart Study*. En este trabajo realizado con un gran número de hipertensos y controles, se asigna al genotipo *D/D* una asociación significativa con HTA en varones. Lo mismo observan Fornage y col (1998). Sin embargo, en la población de Albacete no existe esa

asociación, como tampoco se ha encontrado en otras poblaciones caucásicas. (Popov y col., 1996; Poch y col., 2001).

Con el fin de aclarar estas discrepancias se han realizado dos meta-análisis que merecen ser destacados por recoger un elevado número de estudios sobre la ECA, por su rigurosidad y por su extensión en número de individuos. El primero de ellos realizado por Staessen y col. (1997), incluye 145 estudios y un total de 49.959 sujetos. La conclusión más relevante fue que la frecuencia del alelo *D* era dependiente del grupo étnico, siendo la población negra la que presentaba una mayor frecuencia aunque con diferencias muy pequeñas. El alelo *D* no se encontraba asociado a la HTA en el análisis comparado en grupos homogéneos, es decir de población blanca, negra o asiática, con edades inferiores a 50 años, en todas las edades y en mujeres y hombres por separado y juntos. Sin embargo, observaron que el alelo *D* se comportaba como un marcador de las complicaciones cardiovasculares de la arteriosclerosis y de la nefropatía diabética.

El segundo meta-análisis, realizado por Agerholm-Larsen y col. (2000), analiza 46 trabajos que comprenden un total 32.715 individuos blancos. Comparativamente a otros meta-análisis la inclusión de parámetros fue muy restrictiva. Los autores solamente seleccionaron aquellos trabajos que mostraban un conjunto completo de parámetros, en los que se incluía la medida de la ECA y la PA. Se excluyeron estudios realizados exclusivamente en pacientes con hipercolesterolemia familiar, diabetes *mellitus*, o HTA. Las conclusiones fueron las siguientes que (1) la PA no se ve afectada por el genotipo del gen de la ECA, y (2) el genotipo *D/D* no tiene un valor como marcador para el incremento del riesgo de la enfermedad isquémica cardiovascular.

Si bien todos estos análisis sobre asociación de alelos o genotipos del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA con patologías cardíacas o PA han resultado enormemente controvertidos, ha habido una gran coincidencia en cuanto a los resultados obtenidos al analizar la relación de este polimorfismo con la cantidad de enzima en plasma. La práctica totalidad de estudios, desde el descubrimiento de que la variante *D* era responsable de la mitad de la variación de los niveles de enzima en suero (Rigat y col., 1990), corroboraron esa asociación. Y fue así en todos los grupos étnicos (Rigat y col., 1990; Tiret y col., 1992; Bloem y col., 1996; Forrester y col., 1997; Cooper y col., 1997a; Staessen y col., 1997; Chiang y col.,

1997b; Agerholm-Larsen y col., 1999). Los dos grandes meta-análisis citados (Staessen y col., 1997; Agerholm-Larsen y col., 2000) concluyen que la ECA plasmática se incrementa en mas de un 40% en los individuos con uno o dos alelos *D* en su genotipo.

El estudio aquí presentado coincide con esos hallazgos. Hemos encontrado asociación significativa entre la actividad enzimática en suero y el alelo *D*. Los individuos con genotipo *D/D* tienen los mayores niveles actividad enzimática, seguidos por los *I/D*. Por último, los individuos con genotipo *I/I* presentan los niveles inferiores.

La relación del alelo *D* con el aumento de la actividad enzimática, ha llevado a intentar explicar cómo un polimorfismo localizado en un intrón (secuencia no codificante) puede afectar a la cantidad de enzima. Tired y col. (1992) proponen dos hipótesis alternativas:

1ª) El bajo nivel de ECA podría ser una consecuencia indirecta de una baja expresión del gen de la ECA.

2ª) El nivel plasmático podría estar influenciado por una mutación en desequilibrio de ligamiento con el polimorfismo *I/D* localizada en el mismo gen o en otro próximo, que alterara la digestión proteolítica de la ECA (separación de la membrana plasmática) o por una disminución en la expresión del ARNm para la forma soluble.

La inserción de una secuencia *Alu* de 287 pb caracteriza al alelo *I*. Los trabajos de Okada y col. (1990) y Sinnett y col. (1991), sugieren que las secuencias *Alu* pueden formar una elaborada estructura secundaria similar a la que forman distintos tipos de ARN. Hay que tener en cuenta que las secuencias *Alu* derivan evolutivamente del ARN 7SL, un componente de la partícula que reconoce el péptido señal y facilita el transporte de las proteínas a través de la membrana del retículo endoplásmico. Es posible que estas estructuras secundarias tan elaboradas a lo largo de la cadena de ADN, puedan interferir con una transcripción eficiente por parte de la ARN polimerasa II. Otra posible explicación podría ser que la presencia de esta estructura secundaria en el ARN heterogéneo nuclear (producto primario de la transcripción) afecte a la eficiencia del proceso de eliminación de intrones. El resultado podría ser una alteración

completamente fortuita en el ARNm para una enzima crítica en el control de la PA, la ECA, que ha sido altamente conservada en la evolución durante 600 millones de años (Soubrier y col., 1993).

Recientemente Yoshida y col. (1997) han mostrado que la inserción de 287 pb que caracteriza al alelo *I*, tiene una secuencia muy similar a una secuencia silenciadora (que actúa atenuando la transcripción). Este hallazgo podría explicar porqué los individuos con el genotipo *D/D*, y por lo tanto con ausencia de esa secuencia silenciadora, tienen mayores niveles de ECA en suero. Mizuiri y col. (1997) han hallado una relación entre el polimorfismo *I/D* y valores intrarrenales de ARNm de la ECA, y entre esos valores y las concentraciones de ECA en suero. De este modo y por primera vez se ha encontrado una base molecular a la asociación entre el polimorfismo de la ECA y la enfermedad renal, clave para futuros estudios.

Sin embargo, ni en nuestro estudio ni en la mayoría de los anteriormente citados, se ha encontrado asociación entre mayor actividad enzimática y mayores niveles de PA. Una posible explicación a este hecho es que el incremento de la actividad de la ECA en plasma podría no implicar necesariamente un incremento en las cantidades de AII, como se ha observado en roedores (Schunkert y col., 1990).

Esta hipótesis se ve apoyada por los siguientes hechos:

1º) Los polimorfismos del gen de la ECA no afectan a la PA, a pesar de tener efectos en los niveles de enzima, y ,

2º) Más del 40 % de la AI puede ser convertida en AII por otros mecanismos diferentes a la digestión por la ECA (Hollenberg y col., 1998).

Es bien conocido que la inhibición de la ECA reduce la presión sanguínea. Además, existen evidencias de que la respuesta al tratamiento de la HTA con inhibidores de la ECA, varía en función del genotipo del polimorfismo *I/D*. Aunque aún es pronto para extraer conclusiones, ya que son muy escasos los estudios que se han realizado, se puede inferir una asociación entre el genotipo *D/D* y una mejor respuesta al tratamiento con terapia betabloqueante (O'Byrne y Caulfield, 1998).

Es interesante resaltar que se han detectado diferencias en cuanto a la respuesta a los antihipertensivos dependiendo de la etnia. En individuos hipertensos de población negra comparados con hipertensos de población blanca, se ha observado que la respuesta a los inhibidores de la ECA es muy distinta (He, 1999). Se ha demostrado que los pacientes de población negra requerían entre dos y cuatro dosis más de inhibidores de ECA que los pacientes blancos, para alcanzar una reducción similar de PA. En los hipertensos blancos, la reducción de la PA se correlacionaba con el nivel de ECA en suero, mientras que en pacientes negros esto no ocurría hasta la administración de una dosis alta de inhibidores ECA, lo que sugiere diferencias poblacionales en la regulación de este enzima. En consonancia con estos hallazgos Bloem y col. (1996) hallaron que el polimorfismo *I/D*, asociado a la mitad de la variación de los niveles de ECA sérica en individuos blancos, no estaba relacionado en la misma medida con los niveles enzimáticos en suero en individuos de negros, calculándose alrededor del 25% la proporción de variabilidad.

La ECA presente en la circulación parece provenir de la membrana de las células del endotelio vascular. La enzima se desprende de la membrana por un corte proteolítico del dominio C-terminal insertado en la membrana (Beldent y col., 1993). La ectoproteasa responsable de romper este enlace de membrana aún no ha sido identificada y tanto su función fisiológica como la regulación de este proceso no están bien definidas. Tal vez su caracterización pueda contribuir a explicar en el futuro las diferencias en los niveles de enzima y las diferentes respuestas a inhibidores observadas en distintas poblaciones.

Las diferencias en cuanto a la prevalencia de HTA en individuos negros que viven en América y sus ascendientes en África, así como los caucasianos americanos, podrían deberse tal vez a una diferente regulación de la ECA en plasma y a la influencia de los factores ambientales en esta enzima, al igual que ocurre en el AGT. El trabajo realizado por Cooper y col. (2000) sobre la heredabilidad de la ECA y del AGT en dos poblaciones relacionadas genéticamente, como son los individuos afroamericanos en los EE.UU. y los nigerianos que viven en su país de origen, evidencia como en dos rasgos heredables (ECA y AGT) influyen distintos medioambientes en diferente manera. Los factores genéticos explican sólo una parte de la variación de la ECA y el

AGT, y los niveles de ambas proteínas están influenciados por los factores ambientales. Tanto la ECA como el AGT presentan un grado muy alto de "familiaridad", es decir de asociación intrafamiliar, mucho más acentuada entre familias nigerianas que en estadounidenses. Si en el caso del AGT los factores ambientales están más claros, para la ECA no ocurre lo mismo (Alhenc-Gelas y col., 1991; Cooper y col., 1997b, 2000). En poblaciones africanas como la nigeriana estudiada por el grupo de Cooper, en las que se observan niveles de ECA superiores a los individuos afroamericanos, podrían estar influyendo ciertas enfermedades pulmonares parasitarias, las cuales elevan los niveles de ECA. La oncocerquiasis, asociada con una cantidad de ECA elevada, es endémica de Nigeria y podría estar contribuyendo a elevar la media del nivel de ECA en esa población (Ronday y col., 1996).

También se ha estudiado la influencia del polimorfismo *I/D* en aspectos relacionados con la dieta como es la sensibilidad a la sal. Los estudios realizados reportan resultados contradictorios (Kojima y col., 1994; Hiraga y col., 1996). En población española, un estudio realizado por Giner y col. (2000) encuentra asociado el genotipo *I/I* a una mayor sensibilidad a la sal en pacientes hipertensos.

Con el gen de la ECA se ejemplifica claramente el peso de las interacciones genotipo-medioambiente en el estudio de variables complejas, como es el caso de la PA. En la ECA, el polimorfismo *I/D* determina una variabilidad en la cantidad de enzima en suero que oscila entre el 25% y el 45%, para los mismos genotipos. Esto nos indica que las condiciones ambientales sociales, familiares, patrones en el estilo de vida y del propio individuo, nos proporcionan un mejor conocimiento de la influencia de estas variantes genéticas, que los efectos genéticos aislados del medioambiente. Los resultados negativos subrayan el concepto de que otros factores importantes, tanto genéticos como medioambientales, superan el impacto global de un polimorfismo en particular, por ejemplo el genotipo *D/D*. Por lo tanto, un polimorfismo específico tendrá sólo un pequeño y no significativo efecto sobre el riesgo en el conjunto de la población.

El polimorfismo *I/D* está relacionado con una mayor resistencia en el ejercicio físico y la capacidad en determinados deportes. El genotipo *I/I* está asociado con la eficacia mecánica en el entrenamiento muscular, la mejor

respuesta al entrenamiento y la mayor resistencia física. Se ha propuesto que la baja concentración de ECA propia del genotipo *I/I* podría incrementar la tasa de óxido nítrico, el cual podría mejorar la eficacia de la respiración mitocondrial y por lo tanto la función contráctil en el músculo cardíaco y esquelético (Montgomery y col., 1998; Williams y col. 2000a).

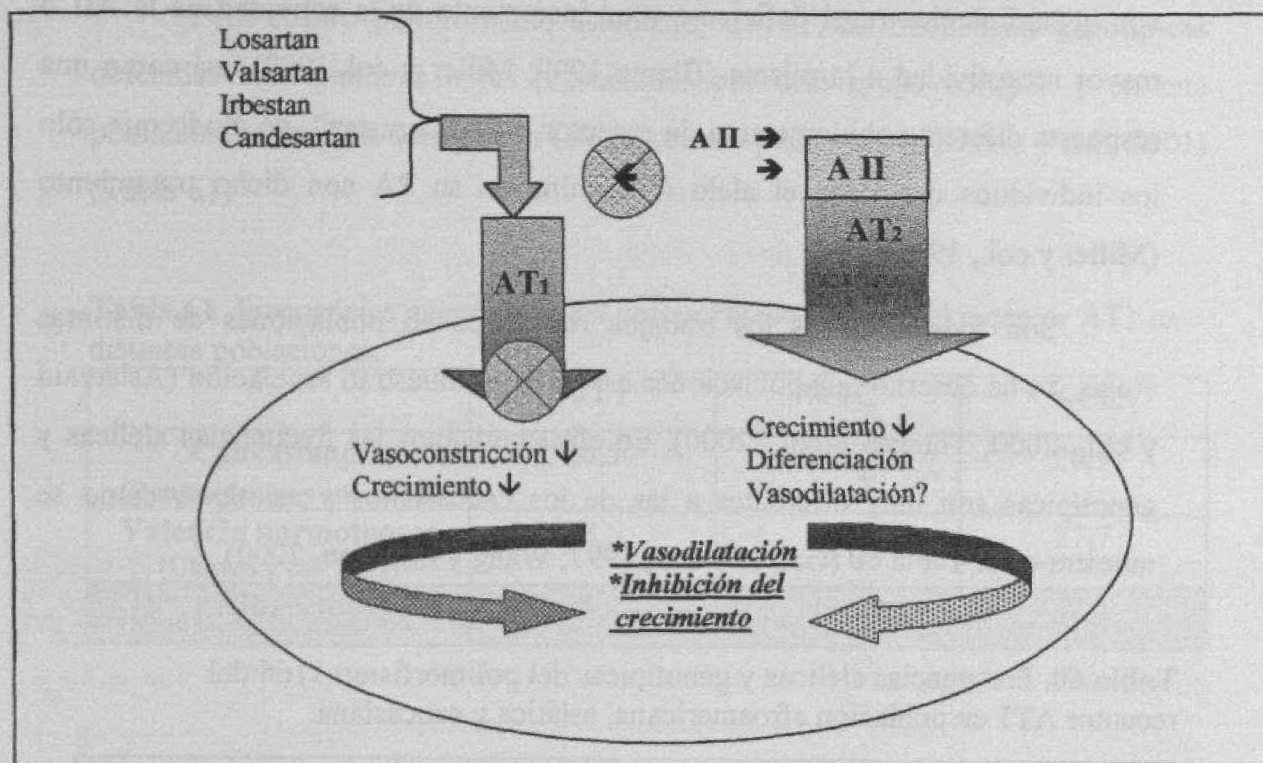
6.5. RECEPTOR TIPO 1 DE LA ANGIOTENSINA II Y PRESIÓN ARTERIAL

El receptor tipo 1 de la angiotensina II (AT1) está ampliamente distribuido en los tejidos periféricos y media la mayoría de las acciones conocidas de la AII, tales como la vasoconstricción, retención renal de sal y de agua, y secreción de hormonas como la aldosterona, vasopresina y oxitocina. Este receptor es responsable del reflejo de los barorreceptores, de la sed, de la natriuresis y de la proliferación celular inducida por la AII (Stroth y Unger, 1999).

La AII induce la proliferación celular vía receptores AT1 en células del músculo liso vascular y en células vasculares endoteliales (Owens y col., 1981). Sin embargo, se ha observado que los receptores AT2 pueden inhibir este efecto. Se cree que la respuesta de proliferación celular de la AII a través de los receptores AT1 está mediada por citoquinas y factores de crecimiento (Stroth y Unger, 1999).

En la Figura 42 se representa el efecto del bloqueo del receptor AT1 en el crecimiento celular y el tono vascular, así como las acciones opuestas del receptor AT2.

Figura 42. Efectos del bloqueo del receptor AT1 por los bloqueantes del mismo (Sartanes) sobre el tono vascular y el crecimiento celular, considerando los efectos adicionales en el receptor AT2, influenciado por el incremento de concentración de AII.



Conocidas estas circunstancias, es lógico que se haya tratado de averiguar las posibles implicaciones de los diferentes polimorfismos del receptor AT1 en el desarrollo de la PA en un estudio poblacional en la provincia de Albacete.

Un estudio pionero con diseño *casos-control* sobre hipertensión asoció el polimorfismo *A1166C* del receptor AT1 en caucasianos con HTA. La frecuencia del alelo *C* fue superior en hipertensos (Bonnardeaux y col., 1994). Este hallazgo se confirmó en otra población caucasiana (Wang y col., 1997) y en una japonesa (Miyamoto y col., 1996), pero no pudo confirmarse en estudios posteriores realizados en población japonesa (Takami y col., 1998), ni australiana (Liyou y col., 1999).

Seis estudios de asociación sobre el polimorfismo *A1166C* realizados en poblaciones europeas, en los que se consideraba la PA como una variable continua, no obtuvieron resultados consistentes (Hingorani y col., 1995;

Castellano y col., 1996; Berge y Berg, 1998; Paillard y col., 1999; Kainulainen y col., 1999; Zhang y col., 2000).

Sin embargo, se ha encontrado una asociación entre el alelo *C* y el endurecimiento aórtico (Benetos y col., 1995). Se ha atribuido al alelo *C* relación con hemodinámica renal deficiente y un incremento de la actividad de la AII o mayor receptividad a la misma (Blantz 1999; Miller y col., 1999), así como una respuesta diferente al bloqueante de receptor AT1 "Losartan", de modo que sólo los individuos que tiene el alelo *C* disminuyen su PA con dicho tratamiento (Miller y col., 1999).

Son todavía pocos los trabajos realizados en poblaciones de distintas etnias. Se ha descrito que poblaciones asiáticas no muestran asociación (Ashavaid y col., 2000; Thomas y col., 2000). En afroamericanos las frecuencias alélicas y genotípicas son muy diferentes a las de los caucasianos y asiáticos, como se muestra en la Tabla 60 (Gainer y col., 1997; Wang y Staessen, 2000).

Tabla 60. Frecuencias alélicas y genotípicas del polimorfismo 1166 del receptor AT1 en población afroamericana, asiática y caucasiana.

	GENOTIPOS (%)			ALELOS (%)	
	AA	AC	CC	A	C
Afroamericanos	92	7	1	95	5
Asiáticos	82,7	16,2	1,1	91	9
Caucasianos	50,2	42,1	7,7	71	29
Albacete	49,8	44,2	6	72	28

El estudio de Wang y Staessen (2000) establece que las bajas frecuencias del alelo *C* en afroamericanos y asiáticos, harían necesarias el uso de muestras mayores en poblaciones con un considerable número de individuos, para asignar un posible valor predictivo a un determinado genotipo.

En el trabajo que aquí se presenta, no se han encontrado asociaciones significativas entre alelos o genotipos del polimorfismo *A1166C* del gen del receptor AT1 y la PA. Tampoco se han hallado asociaciones cuando se han tenido en cuenta los antecedentes familiares de HTA, ni asociación entre los genotipos e IMC. Esta ausencia de asociación podría explicarse por el hecho de que el cambio

en un nucleótido en la región 3' no traducida no tuviese efecto alguno en la regulación del gen, consecuentemente en la distribución, densidad o estructura e la proteína. Por lo tanto esta variante podría no tener relevancia funcional y sus correspondientes fenotipos carecer de efecto en la PA.

Para el otro polimorfismo estudiado, C573T, las frecuencias genotípicas obtenidas son similares a las presentadas por otro grupo europeo y en una población valenciana normotensa (Bonnardeaux y col., 1994; Chaves y col., 2001) (Tabla 61).

Tabla 61. Frecuencias genotípicas del polimorfismo C573T del receptor AT1 en distintas poblaciones.

	%TT	%TC	%CC
Caucasianos (Bonnardeaux y col. 1994)	20,5	50,7	28,9
Valencia normotensos (Chaves y col. 2001)	18,5	53,8	27,7
Albacete	18,2	49,4	32,4

No se ha encontrado asociación entre el polimorfismo C573T y la PA. Tampoco se asocia a antecedentes familiares de HTA, o a IMC, en la población objeto de este estudio. Ello podría deberse a que este polimorfismo C573T no cambia el sentido del codón 191 (CTC→CTT) que codifica una leucina en ambos casos, de modo que las asociaciones que se describan para el mismo probablemente reflejen un desequilibrio de ligamiento con otro polimorfismo en el mismo gen o en otro gen cercano a la región 3q21-q25 donde se ubica. Se ha observado desequilibrio de ligamiento entre los dos polimorfismos analizados en el gen del receptor AT1, A1166C y C573T (Chaves y col., 2001).

Se ha tratado de explicar la razón por la cual mutaciones que no afectan a la estructura de la proteína, tales como las analizadas en el presente estudio, pueden afectar a la PA. El efecto de estas mutaciones sobre la PA es posible que tenga lugar a través de la regulación de la expresión de los receptores AT1, lo que podría influir en el número de receptores AT1 existente en los distintos tipos celulares que expresan el gen. La insensibilización de los receptores del músculo

liso vascular y los receptores glomerulares se estima que ocurre vía desacoplamiento de la proteína G, de alteraciones en el reciclado del receptor, y de la regulación de la transcripción del gen receptor AT1.

El receptor AT1 se regula disminuyendo su número de moléculas en músculo liso y células mesangiales, cuando se expone a dosis altas de AII y en condiciones de bajo NaCl en la dieta o de agotamiento del NaCl. Los receptores AT1 del túbulo proximal y del córtex adrenal responden de forma opuesta, elevando el número y la cantidad de ARNm del receptor AT1 (Cheng y col., 1995; Du y col., 1996).

Ya que el polimorfismo *A1166C* se ubica en la región 3' no traducida del gen, y que no deben existir diferencias estructurales en el producto génico, las diferencias propuestas en la regulación del número de receptores no deben ser consecuencia del desacople de la proteína G o del reciclado y movilidad del receptor AT1. Sin embargo, la regulación anormal del número de moléculas receptor AT1 en respuesta a influencias de la dieta, o de glucomineralcorticoides podría ser la consecuencia de la superactividad de un promotor o la ausencia de un supresor a través de efectos estéricos en la región 3' no traducida. Estas causas darían como resultado un incremento en la actividad transcripcional, la expresión del gen y el número de receptores AT1 que, de este modo, serían insensibles a las influencias de la regulación normal. El efecto se podría expresar en algunas o en todas las células que exhiben receptor AT1. Si esta hipótesis es cierta el efecto genético no radica en el receptor propiamente dicho, sino en una sobreexpresión no regulada del receptor AT1.

6.6. ANÁLISIS CONJUNTO DE LOS POLIMORFISMOS GENÉTICOS DEL SISTEMA RENINA-ANGIOTENSINA

Se ha querido explorar un posible efecto conjunto de tres de los genes analizados en nuestro estudio poblacional: AGT (polimorfismos *T174M* y *M235T*), ECA (polimorfismo *I/D*) y receptor AT1 (polimorfismos *A1166C* y *C573T*). La PA es el resultado de la acción conjunta de muchos genes, y de su interacción con el medioambiente, por ello es interesante estudiar la relación existente entre el fenotipo PA y distintas combinaciones de variantes de los genes implicados en su control. La dificultad de este tipo de análisis estriba en que requiere tamaños muestrales muy elevados.

En el presente estudio no se encontró asociación de ninguna de las combinaciones de genotipos estudiadas con la PA. Una posible explicación podría estar en un error estadístico de tipo II, al carecer el estudio de la potencia suficiente. Para este estudio conjunto sería necesario obtener una muestra formada por un mayor número de individuos. Pese a ello, los resultados obtenidos son concordantes con los observados en otras poblaciones (Kiema y col., 1996, Brand y col., 1998). En el estudio del *Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial* (Poch y col., 2001) (Anexo 5), se analizó el efecto aditivo del polimorfismo T235M del gen AGT y el *I/D* del gen ECA, no encontrándose asociación cuando se analizaron cinco poblaciones españolas (1.204 individuos hipertensos frente a 647 controles).

6.7. ANÁLISIS DE LA ASOCIACIÓN DE POLIMORFISMOS DEL GEN *REN* Y DEL GEN *NOS* CON HIPERTENSIÓN ARTERIAL

6.7.1. Gen de la renina

Se realizó un análisis preliminar de casos-control para estudiar la asociación de polimorfismos de los genes *Ren* y *Nos* con HTA. Tal vez de todos los genes del SRA, el gen que codifica la renina sea el que menos atención ha merecido en cuanto a su papel en la HTA. La razón puede encontrarse en que los primeros estudios de asociación realizados en este gen fueron negativos, por lo que se descartó su uso para estudios posteriores. Además la concentración plasmática de esta proteína es tan elevada que no supone un factor limitante en la producción de angiotensina.

Como ha ocurrido en los otros genes del SRA, los resultados de los estudios de asociación realizados en distintas poblaciones han sido contradictorios. Se han podido constatar asociaciones positivas con la HTA esencial, historia familiar de la HTA y otras enfermedades cardiovasculares (Barley y col., 1991; Okura y col., 1993; Morise y col., 1994a; Frossard y col., 1995, 1998; Dzida, 1996; Chiang y col., 1997). Sin embargo, la mayoría de estudios no detectan asociación entre las variantes polimórficas del gen de la renina y la HTA, como se ha comentado (Morris y Ghtiffiths, 1988; Naftilan y col., 1989; Soubrier y col., 1990; Zee y col., 1991; West y col., 1992, 1994; Jeunemaitre y col., 1992b; Berge y Berg, 1994; Mercure y col., 1995).

En cuanto a posibles diferencias étnicas, es de destacar que los resultados también han sido negativos en población asiática y afrocaribeña (Okura y col., 1992; Daniel y col., 1994).

Más recientemente Frossard y col. (1999), analizaron el polimorfismo *BglII* en dos poblaciones caucasianas y encontraron asociación entre la variante (+) del polimorfismo y la HTA en ambas poblaciones. El símbolo + alude a la presencia

de una diana de restricción *Bgl*II en el intrón 1 del gen. Si no hay sitio de restricción se trata del alelo (-).

Dadas estas discrepancias se ha considerado que abordar el estudio del polimorfismo *Bgl*II en nuestra población era de interés. Además, permitiría completar el análisis de todos los genes del SRA. Se ha llevado a cabo un estudio casos-control empleando dos grupos bien diferenciados de PA, uno de individuos con PA normal y otro de hipertensos. Así hemos hallado el polimorfismo *Bgl*II significativamente asociado con la HTA. Las frecuencias de los genotipos de la población en estudio difieren ligeramente con las encontradas por los grupos de Frossard y col. (1999) (Emiratos Árabes y caucasianos americanos) (Tabla 62).

Tabla 62. Frecuencias genotípicas del polimorfismo *Bgl*II en normotensos e hipertensos de dos poblaciones.

	POBLACION DE ALBACETE Genotipos %			GRUPOS DE FROSSARD Genotipos % (Frossard y col., 1999)		
	--	+ -	++	--	+ -	++
Casos	30,4	49,0	22,0	35,5	47,5	17
Controles	59,0	32,	9,0	46	45	9

El hallazgo de esta asociación indicaría que el genotipo (++), podría ser considerado de riesgo para el desarrollo de HTA en la población de Albacete, si bien no implica necesariamente causalidad. Para determinar si la asociación observada aquí es real o por el contrario espúrea, debería ser testada en otras poblaciones y confirmarse que no se trata de una mutación en desequilibrio de ligamiento con otra mutación que, por ejemplo implique una activación del promotor, o con otro polimorfismo en una región codificante que pueda alterar la estructura de la proteína (ya que el polimorfismo *Bgl*II se encuentra en un intrón). No se desestima sin embargo, como se ha comentado en el caso del polimorfismo *I/D* del gen de la ECA, la posibilidad de que una región intrónica ejerza un mecanismo regulador de la transcripción del gen.

A la vista de estos resultados preliminares está en proyecto realizar los análisis de este polimorfismo en toda la población de estudio. De este modo se podrá comprobar si la asociación con los mayores niveles de PA se mantiene

cuando se analiza una población normal, en la que se contemplan todos los rangos de la PA.

6.7.2. Gen de la óxido nítrico sintasa

Este gen es un candidato interesante para estudiar su relación con la HTA ya que está implicado en la síntesis de óxido nítrico (ON), el principal vasodilatador derivado de endotelio. Además el ON ejerce diversos efectos sobre el sistema cardiovascular e interacciona con componentes del SRA. El ON se encuentra disminuido cuando existe HTA esencial. Se ha comprobado que el déficit de ON induce hipertrofia vascular. Además la inhibición de la ONS endotelial reduce el flujo coronario y eleva la PA (Haynes y col., 1993; Node y col., 1997).

La interacción y el balance entre la AII y el ON son importantes en las enfermedades cardiovasculares y renales. La AII y el ON interactúan en el endotelio, donde ocurre el paso final de síntesis, y también lo hacen en las células del músculo liso vascular, en las células mesangiales, y en la matriz celular. Las células del endotelio contienen ECA, la cual convierte la AI en AII. El ON ha mostrado regular a la baja la síntesis de la ECA en el endotelio y del receptor AT1 en células de músculo liso vascular. De este modo se produce la disminución en la producción de AII y su acción (Raij, 2001). El ON inhibe asimismo la síntesis de endotelina 1 (ET-1), un vasoconstrictor y un promotor del crecimiento de las células de músculo liso vascular y de las células mesangiales. De forma experimental, la inhibición de la síntesis de ON ha dado como resultado el incremento intrarrenal de la síntesis de AII. Clínicamente, el bloqueo de los receptores AT1 normaliza las relajaciones vasculares mediadas por el ON en pacientes con arteriosclerosis (Raij, 2001).

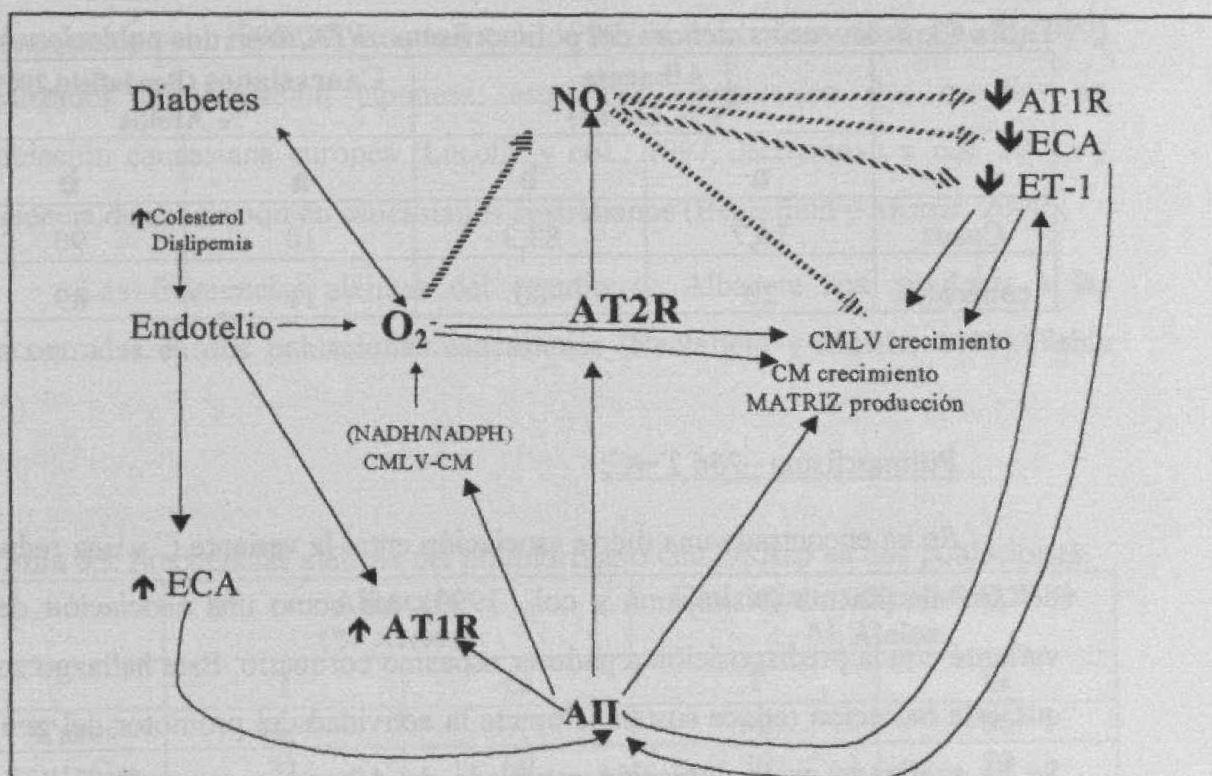
Un nuevo mecanismo recientemente dilucidado implica la interacción entre la AII y el ON. Consiste en la activación de las NADH/NADPH oxidasas que provoca una producción de ion peróxido (O_2^-). La AII conduce a la producción de O_2^- en células de músculo liso vascular, mesangiales y en fibroblastos aórticos. Extracelularmente el O_2^- inactiva el ON, mientras que

intracelularmente activa las MAP quinasas, provocando hipertrofia de las células del músculo liso vascular y de las células mesangiales.

Las acciones de los receptores AT2 son menos conocidas que las del receptor AT1, aunque sí se ha demostrado que en animales adultos se regulan aumentando su número en respuesta a un daño (por ejemplo al infarto de miocardio). Estos receptores se han asociado con la síntesis o secreción de prostaglandinas y ON (Carey y col., 2000).

En la Figura 43 se resumen las relaciones entre el ON y el SRA.

Figura 43. Relaciones entre el ON, O_2^- y AII con los receptores AT1 y AT2.



NO= óxido nítrico; AT1R=receptor tipo 1 de la angiotensina II; AT2R= receptor tipo 2 de la angiotensina II; ECA= enzima convertidora de la angiotensina; AII= angiotensina II; ET1= endotelina 1; CMLV= células de músculo liso vascular; CM= células mesangiales

→ = estimulación; - - - - - = inhibición.

Se ha detectado un número elevado de polimorfismos en el gen de la ONS endotelial, aunque solamente tres han mostrado asociación con HTA y otras patologías cardiovasculares de forma reproducible (Poirier y col., 1999; Benjafield y Morris, 2000). Estos polimorfismos han sido analizados en este trabajo, y son los siguientes:

Polimorfismo VNTR:

La variante alélica *b* de este polimorfismo se ha asociado con mayor cantidad de nitratos y nitritos en plasma (Tsukada y col., 1998), y con HTA en un estudio realizado en japoneses (Uwabo y col., 1998). Sin embargo otros estudios realizados con población japonesa no han confirmado esta asociación (Yasujima y col., 1998; Miyamoto y col., 1999).

En la población estudiada en el presente trabajo no se ha encontrado asociación con HTA de ninguna de las variantes del polimorfismo. Comparando con otras poblaciones caucásicas no se observan diferencias (Tabla 63).

Tabla 63. Frecuencias alélicas del polimorfismo *aVTNRb* en dos poblaciones.

	Albacete (% Alelos)		Caucasianos (BenJafeld,2000) % Alelos	
	a	b	a	b
Casos	16,7	83,3	10	90
controles	20	80	11	89

Polimorfismo -786 T→C:

Se ha encontrado una fuerte asociación entre la variante *C* y una reducción del ON en plasma (Nakayama y col., 1999), así como una asociación de esta variante con la predisposición a padecer espasmo coronario. Este hallazgo sugiere que esta mutación reduce sustancialmente la actividad del promotor del gen *Nos*. Se ha analizado en la población estudiada de Albacete una posible asociación entre este polimorfismo y la HTA, no detectándose dicha asociación. En la Tabla 64 se comparan las frecuencias alélicas de la población de Albacete con las halladas en el trabajo de Nakayama y col. (1999), en la que el grupo "casos" de estos autores se compone de individuos que han sufrido espasmo coronario. La lógica diferencia existente entre las frecuencias alélicas de las dos poblaciones es consecuencia probablemente de la diferencia de etnias entre ambas.

Tabla 64. Frecuencias alélicas del polimorfismo -786 T→C en dos poblaciones.

	Albacete (% Alelos)		Asiáticos (Nakayama 1999) % Alelos	
	T	C	T	C
Casos	53,3	46,7	84	16
controles	54,2	45,8	96,5	3,5

Polimorfismo Glu298Asp:

Se ha encontrado asociación de la variante 298Asp con HTA en dos (Yasujima y col., 1998; Miyamoto y col., 1999) de tres trabajos (Kato y col., 1999) realizados en población japonesa; asociación positiva en dos estudios en población caucasiana europea (Lacolle y col., 1997, Jáchymová y col. 2001) y ausencia de asociación en caucasianos australianos (Benjafield y Morris, 2000).

Las frecuencias alélicas del estudio de Albacete son similares a las encontradas en dos poblaciones caucasianas (Benjafield y Morris, 2000). (Tabla 65).

Tabla 65. Frecuencias alélicas del polimorfismo Glu298Asp en dos poblaciones.

	Albacete (% Alelos)		Caucasianos (Benjafield, 2000) % Alelos	
	T	G	T	G
Casos	42,4	57,6	32	68
controles	31	69	30	70

Resulta de interés destacar que Jáchymová y col. (2001), autores que han encontrado dicha asociación, teorizan sobre una posible explicación para la misma. El residuo de ácido glutámico en la posición 298 se encuentra en mitad de una conformación en hélice alfa. Si se produce la mutación que origina una asparragina, esa hélice alfa cambia su conformación estrechando en una vuelta esa conformación helicoidal, pudiendo afectar este cambio conformacional a la función de la proteína.

En el grupo "hipertensos-normotensos" de este estudio no se ha hallado asociación positiva entre este polimorfismo y la HTA. La ausencia de asociación en los grupos analizados en este trabajo, entre los polimorfismos del gen *Nos* y la HTA podría explicarse por un número insuficiente de individuos analizados. También podría deberse a la implicación de otros genes, además del *Nos*, en la deficiencia de producción de ON en individuos hipertensos.

6.7.3. Niveles de ON en suero

En la población objeto de este estudio se observa una mayor cantidad de ON en los individuos normotensos, aunque sin diferencias significativas.

Algunas investigaciones indican que la disminución de los niveles de ON en individuos hipertensos es una consecuencia de la HTA más que una causa (Brown, 1997). Sin embargo, se ha demostrado en experimentos realizados en ratones con el gen *Nos* truncado, que éstos incrementaban su PA (Huang y col., 1995). La búsqueda de mutaciones puntuales en el gen *Nos* humano no ha encontrado consenso general, como se vio en párrafos anteriores. Por otro lado, el incremento de la expresión del gen *Nos*, constituye una posible estrategia para desarrollar nuevas formas de terapia antihipertensiva. De hecho, el incremento de la producción de ON subyace en alguna de las terapias cardiovasculares usadas como antihipertensivas. Por ejemplo, el ejercicio físico y las estatinas, han mostrado incrementar la expresión de la ONS en la pared de los vasos, y esto podría intervenir en los modestos efectos de disminución de la PA observados. La terapia con estrógenos incrementa la expresión de la ONS en ratas y puede ser la razón oculta que explicaría alguno de los efectos cardioprotectores de los estrógenos. También aclararía porqué los estrógenos postmenopausia reducen el riesgo de padecer hipertensión en mujeres tratadas. Los inhibidores de la ECA, como se comentó anteriormente, aumentan la producción de bradiquinina activando mediante receptores la ONS endotelial y por lo tanto mejorando la vasodilatación (Thomas y col., 2001). El conocimiento de estos mecanismos y la vía por la cual las deficiencias en ON causan HTA pueden constituir nuevas dianas para el desarrollo de drogas antihipertensivas.

6.8. PERSPECTIVAS

La identificación de los genes implicados en el control de la PA ha supuesto esfuerzos muy considerables en los últimos diez años. El estudio de los genes candidatos ha contrastado el nivel de la PA con las variantes genéticas de esos genes. Los genes del SRA son los que más evidencias han aportado al conocimiento de la variación de la PA y han demostrado su participación en la fisiología de la PA.

Si embargo, y aunque se han establecido algunos de los polimorfismos de los genes del SRA como elementos que influyen la variación de la PA, en todos los genes analizados ha existido controversia, debido a la falta de uniformidad entre los resultados de distintos autores, como ha quedado reflejado en esta discusión. Muchos de los estudios en los que se atribuía una influencia inequívoca al desarrollo de una u otra alteración cardiovascular, no han podido reproducirse en otras poblaciones, poniendo en duda la contribución de determinados *loci* a la variación de la PA en población general (Corvol y col., 1999; Niu y col., 1999; Luft, 2000). Sin embargo, existen razones que pueden explicar porqué los resultados han sido tan controvertidos.

Pickering (1967) ya indicó que la presión sanguínea es una variable continua y que la hipertensión como tal no existe. Sin embargo, desde su trabajo se ha estado asumiendo lo contrario y dividiendo la "entidad inexistente hipertensión", en categorías tales como HTA sensible-no sensible a la sal, HTA renina alta-renina baja, HTA de bata blanca, severa-no severa, etc. Los fenotipos intermedios podrían ser de ayuda para el conocimiento de la PA, pero requerirían esfuerzos importantes para controlar dietas, hormonas y otros factores añadidos, que en muchos de los estudios no se realizaron. Sería tal vez más adecuado concentrarse en poblaciones generales o individuos normotensos, en la búsqueda de *loci* que influyen en la PA en personas supuestamente sanas, ya que la clasificación de los individuos como hipertensos es bastante arbitraria (Luft, 1998). Es lógico pensar que los genes que tienen influencia en la PA deberían contribuir al desarrollo de la HTA esencial (Colhoun, 1999).

Otra razón por la que pueden explicarse los resultados contradictorios estaría en el hecho de que la PA es un rasgo complejo con determinantes tanto genéticos como medioambientales. La heredabilidad (o *sensu lato* la contribución genética) de la PA varía entre el 30 % y el 50 % (Ward, 1995), de modo que, en la mayor parte de las ocasiones, la influencia de los factores ambientales es superior (hasta el 70%) a la de los determinantes genéticos. No es extraño que un mismo genotipo para un determinado gen, que en una población confiera susceptibilidad a una elevación de la PA, pueda ser neutral en otra población con un entorno diferente (dieta, clima, estrés, inactividad, etc.).

Los factores genéticos juegan ciertamente un papel en la determinación de la PA dentro de una población, pero parecen tener muy poco que decir respecto a las marcadas diferencias en los niveles de PA y la prevalencia de la HTA entre distintas poblaciones.

El gen que más nos ilustra sobre este particular es del *Agt*. Se ha podido saber, a través de los estudios poblacionales, que la variante *235T* de este gen representa el alelo ancestral del mismo. En población africana esta variante es mucho más frecuente (hasta más del 90%) que en población blanca (35 %), con un gradiente de frecuencias que refleja el efecto de la mezcla racial y la diáspora del continente africano hacia América en el triste periodo de la esclavitud. Los individuos afroamericanos presentan frecuencias intermedias entre la población blanca y sus ancestros africanos.

El alelo *T* se ha relacionado con el aumento de la PA en muchos estudios poblacionales, en población caucásica y sobre todo en afroamericanos, como ya se ha comentado. Sin embargo, en población africana (cuya frecuencia de este alelo es muy superior) que permanece en sus sociedades de origen, la prevalencia de la HTA es muy escasa. En EE.UU. los individuos de origen africano, con proporciones inferiores del alelo *235T* que sus ancestros pero superiores a los caucásicos, son los que presentan las mayores tasas de HTA. Esto ocurre en una sociedad industrializada y con estilos de vida muy diferentes en hábitos, ingesta de sodio y grasas, sedentarismo, etc., al entorno africano.

Cooper y col. (2000) estudiaron la heredabilidad del AGT en familias nigerianas comparándolas con familias afroamericanas de los EE.UU., dos

poblaciones que, compartiendo una base genética común, están siendo expuestas a gradientes en estilos de vida diferentes, dando como resultado en la segunda de ellas, una amplia gama de tasas de prevalencia para enfermedades tales como HTA, enfermedades cardiovasculares, obesidad y diabetes entre otras. Estos autores encuentran que la heredabilidad del AGT y de la ECA entre familias nigerianas es muy superior a la observada entre familias afroamericanas. La explicación puede encontrarse en el hecho de que los factores ambientales dependientes del azar en EE.UU. a escala individual, son muy superiores a lo que ocurre en Nigeria. Las diferencias en el estilo de vida son fácilmente reconocibles. Por ejemplo, en los hogares nigerianos los patrones de alimentación son más consistentes, las posibilidades de comer fuera del entorno familiar son muy reducidas, y las familias, normalmente grandes, comparten el mismo espacio vital gran parte de su vida. La media de actividad física en Nigeria es muy superior y la ingesta de sodio inferior.

Este estudio demuestra de forma muy clara, que al comparar dos poblaciones de ancestro común en diferentes ambientes sociales, se aprecian grandes diferencias en la media de los valores estudiados, sobre todo en el AGT, y grandes diferencias en la agregación familiar entre estos dos países. Este interesante estudio demuestra que un mejor conocimiento del rango de variación en la heredabilidad de la PA y los rasgos asociados, podría dar mayor precisión a los estudios de asociación, en lugar de tener en cuenta únicamente factores genéticos aislados e intentar encontrar en ellos "marcadores moleculares" de riesgo de valor general.

La variación alélica del AGT en humanos proporciona una pista interesante sobre su función ancestral. Los estudios poblacionales sugieren que la variante 235T es la forma ancestral del gen (el alelo salvaje) y la M235 es la nueva forma (el alelo mutado). Esto queda demostrado por la gran prevalencia del alelo T en la mayoría de poblaciones humanas y la presencia de este alelo en primates. Si este alelo se ha asociado con el incremento de actividad del SRA (recuérdese que se asocia con una mayor cantidad de AII en plasma), podría quizás conferir una ventaja para la retención de sal y para el control de volumen de líquido y presión sanguínea, en un tiempo ancestral en el que el acceso a la sal del ser humano era limitado (Lifton, 1996). Nuestra especie evolucionó en un entorno

pobre en sal del África subsahariana, y esto supuso que era más adaptativo retener aquellos alelos que promovían una avidez para la retención de sal y de agua (Lifton, 2001).

Asimismo la "termotolerancia", término acuñado que significa la capacidad para resistir en un entorno con altas temperaturas, es una propiedad crítica para sobrevivir. El calor es un factor medioambiental crítico para la selección natural desde el comienzo de la vida en la Tierra (Pandolf y col., 1988). La respuesta fisiológica de los mamíferos terrestres a una elevada temperatura ambiente es compleja y comprende el mecanismo de la sudoración y la conservación renal de sodio y agua. Los mamíferos de climas tropicales o subtropicales, como es en su origen el *Homo sapiens*, debían sudar para mantener la homeotermia. El SRA está íntimamente ligado a los mecanismos de sudoración (Kirby y Convertino, 1986). La pérdida de volumen durante el proceso de sudoración incrementa la actividad de la renina en el plasma, dando lugar a un aumento de la aldosterona plasmática. Así, los mecanismos fisiológicos de termotolerancia como la hipertrofia de las glándulas sudoríparas, y la retención renal de sodio y agua durante la aclimatación al calor, podrían ser también la consecuencia de la alta prevalencia de HTA esencial e HTA sensible a la sal entre los descendientes de los que fueron esclavos africanos. Estos sobrevivieron gracias a estar mejor adaptados a condiciones extremas de calor, falta de agua y sal y una alta capacidad de soportar condiciones extremas de temperaturas elevadas y de hacinamiento que supuso su traslado desde su continente natal África hacia otras tierras. Tal vez esas variantes genéticas que les hicieron entonces sobrevivir, puedan estar ahora ocasionando las altas prevalencias en las enfermedades anteriormente mencionadas (Moskowitz, 1996).

Siguiendo la diáspora humana hacia entornos ricos en sal, estos mismos alelos que fueron un valor selectivo en nuestro entorno ancestral, en la evolución del *H. sapiens*, pueden ahora estar contribuyendo a elevar la PA y desencadenar sus mórbidas consecuencias, en sociedades industrializadas, con condiciones muy alejadas del entorno natural primitivo del ser humano.

No se pueden olvidar, por último, entre las razones que pueden dar respuesta a los diferentes resultados entre las poblaciones, que en la inmensa mayoría de estos estudios se intenta atribuir una asociación a un solo

polimorfismo de un gen que en el mejor de los casos forma parte de un sistema. Si nos fijamos en un individuo, su PA no es el resultado de uno sólo de los genes del SRA, como mínimo deberíamos conocer cómo se combinan entre sí las variantes de todos los genes que componen dicho sistema (incluso de otros sistemas que influyen en esa variable). Existen datos que sugieren al menos dos clases de interacciones gen-gen: en individuos australianos Zee y col. (1996) observaron que los niveles de renina eran significativamente inferiores en los individuos que tenían el genotipo *D/D* de la ECA en comparación con los que eran *I/I*, aunque los valores de AGT no variaban según el genotipo de la ECA. También se ha constatado una relación epistática entre el polimorfismo *A1166C* del receptor AT1 y el gen de la ECA en enfermedades cardiovasculares (Wang y Staessen, 2000).

Williams y col. (2000b) sostienen que los datos confusos sobre los resultados de los estudios de asociación entre los genes de susceptibilidad de HTA, son debidos a que se han focalizado en el estudio en genes específicos aislados, no detectando las interacciones gen-gen. Estos autores examinan el efecto de las interacciones de los alelos de 3 genes candidatos del SRA (AGT-174, AGT-235, ECA-*I/D*, receptor AT1-1166 detectando que determinadas combinaciones se encuentran asociadas con un incremento de la PA. Postulan que tales interacciones pueden responder a los hallazgos inconsistentes de estudios previos, ya que casi siempre se han examinado los efectos de un único *locus* sin considerar el efecto de la variación de otros *loci* potencialmente interactivos. Es evidente que este tipo de estudios ha adolecido de un concepto clásico en genética como es la epistasia o interacción entre *loci*.

El principal problema para realizar este tipo de análisis que implican a varios genes es la necesidad de poblaciones enormes, en las que distintos genotipos estén representados con suficiente número de individuos. En un futuro no lejano es de prever que existan *microchips* de ADN, con un número aún no determinado de genes, quizás cientos, que tengan reconocida influencia en las variaciones de la PA, y que aporten el genotipo completo con las variantes genéticas que afecten y confieren susceptibilidad en una población determinada, lo que requerirá el análisis de un gran número de individuos que compartan el mismo ambiente.

El principal objetivo de la Epidemiología Genética es identificar y caracterizar los factores genéticos que contribuyen a la enfermedad en una población. Todas las enfermedades y todos los fenotipos están sometidos a las influencias de los genes y de factores medioambientales, y los estudios en epidemiología genética deben acomodarse a ese hecho. De sus disciplinas parentales, genética y epidemiología, la disciplina ha heredado los elementos clave en el estudio de poblaciones definidas, al tiempo que se investiga el papel de los genes y del entorno y de las relaciones entre ambos.

La variación de la PA constituye un buen ejemplo para los estudios en epidemiología genética. En ellos es necesario caracterizar los factores que influyen en esa variable en una determinada población y analizar el peso de los componentes genéticos, ambientales y las interacciones entre los mismos, así como la heredabilidad de los genotipos en esa población.

A la vista de lo que ocurre con la variación de la PA y tal vez de otros rasgos fisiológicos cuyo conocimiento será relevante en la prevención de enfermedades, es predecible que el tipo de estudios y su diseño se guiarán por pautas emergentes y nuevas disciplinas como las que a continuación se exponen:

- *Demografía genética.* En primer lugar habrá de conocerse la arquitectura genética de la población, conociendo las frecuencias alélicas, frecuencia de enfermedades, estímulos ambientales, endogamia, tasa de inmigración, y conocimiento de los desequilibrios de ligamiento.
- *Polimorfismos "candidatos".* Se deberán asignar genes candidatos, con los métodos conocidos de estudios de asociación, casos-control, test de haplotipos, etc.
- *Ecogenética.* Se tendrá que conocer en cada población las propiedades únicas de la misma, investigando y contrastando la presencia de los genes con factores tales como polución, sobrepoblación, dieta y patógenos.
- *Farmacogenética.* Emergerá como una disciplina futura de gran impacto clínico, será imprescindible conocer la respuesta a los fármacos dependiendo del genotipo del individuo. La determinación genética de la población, su ecología y entorno, contribuirán al éxito o fallo de una estrategia terapéutica.

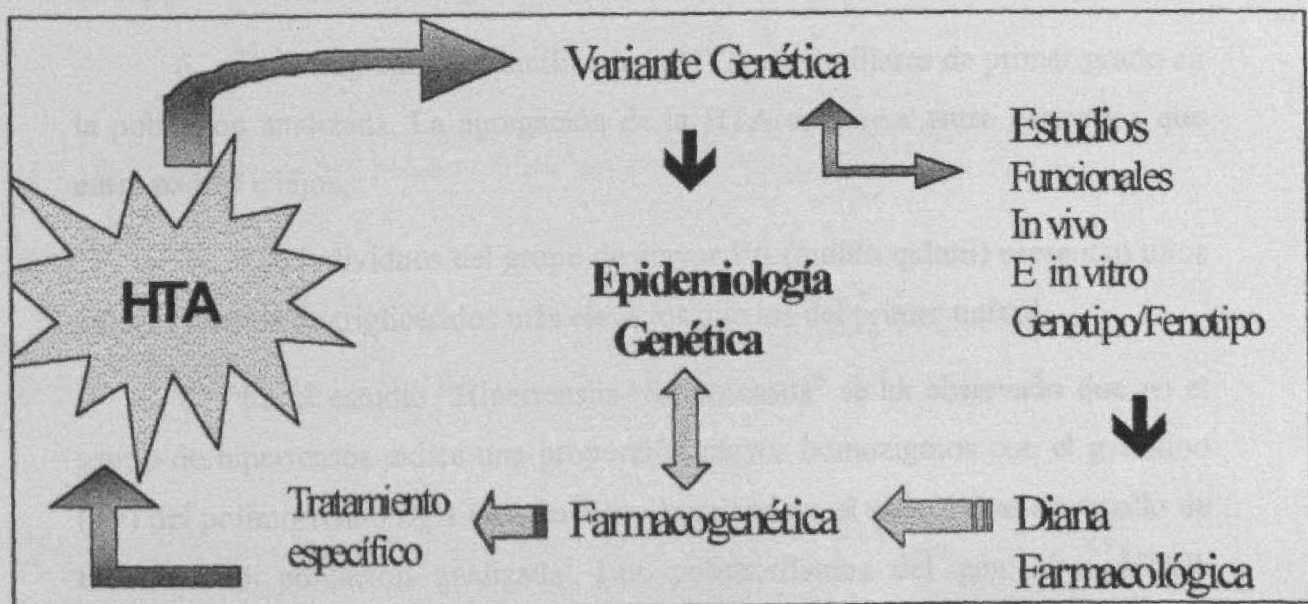
Como vimos anteriormente, se empiezan a definir los genotipos más adecuados para determinadas drogas antihipertensivas (Miller y col., 1999).

- La *Medicina de la evolución*. Conocer las hipótesis sobre el significado evolutivo de las enfermedades dota a los epidemiólogos-genetistas de un bagaje teórico para su trabajo. En HTA, por ejemplo, la respuesta a estímulos potencialmente peligrosos seleccionados en los humanos primitivos, implica mecanismos fisiológicos establecidos en la especie y potencialmente detrimentales en el seno de la sociedad moderna.

Aunque aún no contemos con todas las herramientas que la tecnología dotará en el futuro a los estudios en epidemiología genética, los análisis de poblaciones, como el que se presenta en esta memoria, son de gran utilidad para el conocimiento de la distribución de los alelos que tienen influencia en la PA. Es importante la asignación de genotipos de susceptibilidad en cada población a definir. La interacción de los genotipos de la población con los factores ambientales específicos de la región, sus costumbres sociales, modos de alimentación y características propias es determinante, con el propósito de definir perfiles de riesgo.

Todo este conocimiento integrado puede ayudar antes del establecimiento de la enfermedad, sin duda alguna, a su prevención y control (Figura 44).

Figura 44. Integración de distintas disciplinas para el conocimiento y control de la HTA



7. CONCLUSIONES

1. Las frecuencias alélicas y genotípicas de los polimorfismos estudiados de los genes *Agt*, de la ECA y del receptor AT1 son similares a las observadas en otras poblaciones españolas y caucásicas.
2. Los polimorfismos *T174M* y *M235T* del gen *Agt*, *I/D* del gen de la ECA y *A1166C* y *C573T* del gen del receptor AT1 no se han encontrado asociados a PA en la población de Albacete.
3. El genotipo conjunto del gen *Agt*, *T174T-T235T*, se encuentra en mayor proporción en individuos con historia familiar de HTA, pudiendo considerarse como potencial marcador de predisposición a hipertensión en individuos con una historia familiar de HTA. Las variantes polimórficas T174-235T del AGT podrían tener distinta estructura secundaria, lo que justificaría una función diferente y por lo tanto explicaría la asociación encontrada.
4. El alelo *D* del gen de la ECA está asociado a un incremento en la actividad enzimática de la misma, siendo los individuos con el genotipo *DD* los que presentan mayor actividad de la ECA.
5. En la población estudiada el IMC es mayor en los individuos de mayor PA (quinto quintil), éstos presentan sobrepeso en un porcentaje superior a los de menor PA (primer quintil). No se ha encontrado asociación entre ninguno de los polimorfismos de los genes analizados y esta variable.
6. Existe agregación familiar de la HTA en familiares de primer grado en la población analizada. La agregación de la HTA es mayor entre hermanos que entre padres e hijos.
7. Los individuos del grupo de mayor PA (quinto quintil) presentan unos valores medios de triglicéridos más elevados que los del primer quintil.
8. En el estudio "Hipertensos-Normotensos" se ha observado que en el grupo de hipertensos existe una proporción mayor homocigotos con el genotipo (++) del polimorfismo *BglII* del gen *Ren*. Asociándose el alelo (+) al desarrollo de HTA en la población analizada. Los polimorfismos del gen *Nos*: *VTNR*,

Glu298Asp y -786 , no han mostrado asociación con HTA. En el grupo Hipertensos se observa una cantidad inferior de ON sérico a la obtenida en el grupo Normotensos.

8. BIBLIOGRAFÍA

- Adams JP, Ward RH (1973). Admixture studies and detection of selection. *Science* 180:1137-1143.
- Agerholm-Larsen B, Tybjeerg-Hansen A, Schnor P, Nordestgaard BG (1999). ACE gene polymorphism explains 30-40 % of variability in serum ACE activity in both women and men in the population at large: the Copenhagen City Heart Study. *Atherosclerosis* 147: 425-427.
- Agerholm-Larsen B, Nordestgaard BG, Tybjeerg-Hansen A (2000). ACE gene polymorphism in cardiovascular disease. Meta-analyses of small and large studies in whites. *Atheroscler Thromb Vasc Biol* 20: 484-492.
- Alderman MHS, Madhavan S, Ooi WL, Cohen H, Sealey JE, Larragh JH (1991). Association of the renin-sodium profile with the risk of myocardial infarction in patients with hypertension. *New Engl J Med* 324: 1098-1104.
- Alhenc-Gelas F, Richard J, Courbon D (1991). Distribution of plasma angiotensin converting enzyme levels in healthy men: relationship to environmental and hormonal parameters. *J Lab Clin Med* 117: 33-38.
- Artigao Rodenas LM (1998). Enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en población general de Albacete. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Medicina. Madrid.
- Ashavaid TF, Shalia kk, Nair KG, Dalal JJ (2000). ACE and AT1R gene polymorphisms and hypertension in Indian Population. *J Clin Lab Anal* 14: 230-237.
- Atwood LD, Kammerer CM, Samollow PB (1997). Linkage of essential hypertension to the angiotensinogen locus in Mexican Americans. *Hypertension* 30: 326-330.
- Aviv A, Aladjem M (1990). Essential hypertension in blacks: epidemiology, characteristics roles of racial differences in sodium, potassium and calcium regulation. *Cardiovascular Drugs Ther* 4: 335-342.
- Ayman D (1934). Heredity in arteriolar (essential) hypertension: a clinical study of blood pressure of 1,524 members, 277 families. *Arch Intern Med* 53: 792-803.
- Barley J, Carter ND, Cruickshank JK, Jeffery S, Smith A, Charlett A, Webb DJ (1991). Renin and atrial natriuretic peptide restriction fragment length polymorphisms: Association with ethnicity and blood pressure. *J Hypertens* 9: 993-996.
- Barley J, Blackwood A, Nicholar D, Carter ND, Crews DE, Cruickshank JK, Jeffery S, Ogunlesi AO, Sagnella GA (1994a). Angiotensin-converting enzyme insertion/deletion polymorphism: association with ethnic origin. *J Hypertens* 12: 955-957.
- Barley J, Blackwood A, Sagnella G, Markandu N, MacGregor G, Carter N J (1994b). Angiotensinogen Met235→Thr polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white population. *J Hum Hypertens* 8: 639-640.
- Barley J, Blackwood A, Miller M, Markandu ND, Carter ND, Jeffery S, Cappuccio FP, MacGregor GA (1996). Angiotensin converting enzyme gene I/D polymorphism, blood pressure and the renin-angiotensin system in Caucasian and Afro-Caribbean peoples. *J Hum Hypertens* 10: 31-35.
- Beaglehole R, Salmond CE, Prior IAM (1975). A family study of blood pressure in Polynesians. *Int J Epidemiol* 4: 217-220.

- Bechgaard A (1946). Arterial hypertension. A follow up study of 1.000 hypertonics. *Acta Med Scand* 172: 1-158.
- Beldent V, Michaud A, Wei L, Chuvet MT, Corvol P (1993). Proteolytic release of human angiotensin-converting enzyme. Location of cleavage site. *J Biol Chem* 268: 26428-26434.
- Benetos A, Topouchian J, Ricard S, Gautier S, Bonnardeaux A, Asmar R, Poirier O, Soubrier F, Safar M, Cambien F (1995). Influence of angiotensin II Type 1 receptor polymorphisms on aortic stiffness in never-treated hypertensive patients. *Hypertension* 26: 44-47.
- Benjafield AV, Morris BJ (2000). Association analyses of endothelial nitric oxide synthase gene polymorphisms in essential hypertension. *Am J Hypertension* 13: 994-998.
- Bennett CL, Schrader AP, Morris BJ (1993). Cross-sectional analysis of Met235→Thr variant of angiotensinogen in severe hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 197: 833-839.
- Berge KE, Berg K (1994). No effect of a polymorphism at the renin (REN) locus on blood pressure level or variability. *Clin Genet* 46: 436-438.
- Berge KE, Berg K (1998). Polymorphisms at the angiotensinogen (AGT) and angiotensin II Type 1 receptor (AT1R) loci and normal blood pressure. *Clin Genet* 53: 214-219.
- Biron P, Mongeau JG, Bertrabd D (1976). Familial aggregation of blood pressure in 588 adopted children. *Can Med Assoc J* 115: 773-774.
- Blantz RC (1999). Why are some people more receptive to angiotensin II? *Kidney Int* 56: 2316-2317.
- Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH (1995). The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 95: 948-943.
- Bloem LJ, Manatunga AK, Pratt JH (1996). Racial difference in the relationship of an angiotensin-converting enzyme gene polymorphism to serum angiotensin-converting enzyme activity. *Hypertension* 27: 62-66.
- Bonnardeaux A, Davies E, Jeunemaitre X, Fery I, Charru A, Clauser E, Tiret L, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1994). Angiotensin II type 1 receptor gene polymorphisms in human essential hypertension. *Hypertension* 24: 63-69.
- Botero-Vélez JJ, Curtis DG, Warnock DG (1994). Brief report: Liddle's syndrome revisited a disorder of sodium reabsorption in the distal tubule. *N Engl J Med* 330: 178-181.
- Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Cittero L, Grobbee D (1998). Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension* 31: 725-729.
- Brown MJ (1997) Science, medicine, and the future: hypertension. *Br Med J* 314: 1258-1261.
- Burt VL, Whelton P, Roncella EJ, Brown C, Cutler JA, Higgins M, Horan MJ, Labarthe D (1995). Prevalence of hypertension in US adult population. Results from the Third National Health and Nutrition Examination Survey, 1988-1991. *Hypertension* 25: 305-313.
- Burton J, Quinn T (1986). The amino-acid residues on the C-terminal side of the cleavage site of angiotensinogen influence the species specificity of reaction with renin. *Biochem Biophys Acta* 54: 361-364.

- Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herberth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF, Allegrini J, Bloch C (1988). Familial resemblance of plasma angiotensin converting enzyme levels. *Am J Hum Genet* 43: 774.
- Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D, Luc G, Bard JM, Bara L, Ricard S (1992). Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting-enzyme is a potent risk factor for myocardial infarction. *Nature* 359: 641-644.
- Cambien F, Costerousse O, Tiret L, Poirier O, Lecerf L, Gonzales MF, Evans A, Arveiler D, Cambou JP, Luc G, Rakotovo R, Ducimetiere P, Soubrier F, Alhenc-Gelas F (1994). Plasma level and gene polymorphism of Angiotensin-converting-enzyme in relation to myocardial infarction. *Circulation* 90: 669-676.
- Cardillo C, Kilcoyne CM, Quyyumi AA, Cannon RO 3rd, Panza JA (1998). Selective defect in nitric oxide synthesis may explain the impaired endothelium-derived vasodilatation in patients with essential hypertension. *Circulation* 97: 851-856.
- Carey RM, Wang ZQ, Siragy HM (2000). Role of the angiotensinogen type II receptor in the regulation of blood pressure and renal function. *Hypertension* 35: 155-163.
- Carrión Valero L (2001). Análisis epidemiológico de los extremos poblacionales de los niveles de presión arterial. Evaluación de su significado clínico, analítico, y genético. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Medicina. Madrid.
- Cassis AL, Saye JA, Peach MJ (1998). Location and regulation of rat angiotensinogen messenger RNA. *Hypertension* 11: 591-596.
- Castellano M, Muiesan ML, Beschi M, Rizzoni D, Cinelli A, Salvetti M, Pasini G, Porteri E, Bettoni G, Zulli R, Agabiti-Rosei E (1996). Angiotensin II Type 1 receptor A/C 1166 polymorphism. Relationships with blood pressure and cardiovascular structure. *Hypertension* 28:1076-1080.
- Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark A (1994). Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Eng J Med* 330: 1629-1633.
- Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farral M, Kamdar S, Daniel H, Lawson M, De Freitas P, Fogarty, Clark AJ (1995). Linkage of the angiotensinogen gene locus to human essential hypertension in African Caribbeans. *J Clin Invest* 96: 687-92.
- Chakraborty R, Kamboh MI, Nwanko M, Ferrell RE (1992). Caucasian genes in American blacks: New data. *Am J Hum Genet* 50: 145-155.
- Chang SS, grunder S, Hanikoglu A, Rosler A, Mathew PM, Hanukoglu I, Schild L, Lu Y, Shimkets RA, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP (1996). Mutations in subunits of the epithelial sodium channel cause salt wasting with hyperkalaemic acidosis, pseudohypoaldosteronism type 1. *Nat Genet* 12: 248-253.
- Chaves FJ, Pascual JM, Rovira E, Armengod ME, Redón J (2001). Angiotensin II type I receptor gene polymorphism and microalbuminuria in essential hypertension. *Am J Hypertens* 14: 364-370.
- Cheng HF, Becker BN, Burns KD, Harris RC (1995). Angiotensin II upregulates type I angiotensin II receptors in renal proximal tubule. *Clin Invest* 95 2012-2019.
- Chiang FT, Hsu KL, Tseng CD, Lo HM, Chern TH, Tseng YZ (1997a). Association of the renin gene polymorphisms with essential hypertension in a Chinese population. *Clin Genet* 51:370-374.
- Chiang FT, Lai ZP, Chern TH, Tseng CD, Hsu KL, Lo HM, Tseng YZ (1997b). Lack of association of the angiotensin converting enzyme polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens* 10: 197-201.

- Christiakov DA, Turakulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV (1999). Polymorphism of angiotensinogen T174M gene and cardiovascular diseases in the Moscow population. *Genetika* 35: 1160-1164.
- Clauser E, Curnow KM, Davies E, Conchon S, Teutsch B, Vianello B, Monnot C, Corvol P (1996). Angiotensin II receptors: protein and gene structures, expressions and potential pathological involvements. *Eur J Endocrinol* 134: 403-411.
- Cohen P, Badouaille G, Gimenez-Roqueplo AP, Mani J-C, Guyene T-T, Jeunemaitre X, Menard J, Corvol P, Pau B, Simon D (1996). Selective recognition of M235T angiotensinogen variants and their determination in human plasma by monoclonal antibody-based immunoanalysis. *J Clin Endocrinol Metab* 81: 3505-3512.
- Colhoun H (1999). Confirmation needed for genes for hypertension. *Lancet* 353: 1200-1201.
- Cooper RS, Rotimi CN (1994). Hypertension in populations of West African origin: is there a genetics predisposition? *J Hypertens* 12: 215-227.
- Cooper R, Rotimi S, Ataman S, McGee D, Osotimehin B, Kadiri S, Muna W, Kingue S, Fraser H, Forrester T, Bennett F, Wilks R (1997a) The prevalence of hypertension in seven populations of West Africa origin. *Am J Public Health* 87: 155-156.
- Cooper R, McFarlane Anderson N, Bennett FI, Wilks R, Puras A, Tewksbury D, Ward R, Forrester T (1997b). ACE, angiotensinogen and obesity: a potential pathway leading to hypertension. *J Hum Hypertens* 11: 107-111.
- Cooper R, Forrester T, Ogunbiyi O, Muffinda J (1998). Angiotensinogen levels and obesity in four black populations. ICSHIB Investigators. *J Hypertens* 16: 571-575.
- Cooper RS, Guo X, Rotimi CN, Luke A, Ward R, Adeyemo A, Danilov SM (2000). Heredability of angiotensin-converting enzyme and angiotensinogen. A comparison of US Blacks and Nigerians. *Hypertension* 35: 1141-1147.
- Corvol P, Michaud A, Soubrier F, Williams (1995). Recents advances in knowledge of the structure and function of the angiotensin I converting enzyme. *J Hypertens* 13: S3-S10.
- Corvol P, Soubrier F, Jeunemaitre X (1997). Molecular genetics of the Renin-angiotensin-aldosterone system. *Pathol Biol* 45: 229-239.
- Corvol P, Persu A, Giménez-Roqueplo AP, Jeunemaitre X (1999). Seven lessons from two candidate genes in human essential hypertension. Angiotensinogen and epithelial sodium channel. *Hypertension* 33: 1324-1331.
- Cousterouse O, Jaspard E, Wei L, Corvol P, Alhenc-Gelas F (1992). The angiotensin I converting enzyme (Kinase II): molecular organization and regulation of his expression in humans. *J Cardiovasc Pharmacol* 20: S10-S15.
- Cousterouse O, Allegrini J, Lopez M, Alhenc-Gelas F (1993). Angiotensin converting enzyme in human peripheral mononuclear cells: main expression in T lymphocytes under the influence of a genetic polymorphism. *Biochem J* 290: 33-40.
- Crews DE (1988). Body weight, blood pressure, and the risk of total and cardiovascular mortality in an obese population. *Hum Biol* 30: 417-423.
- Crews DE (1998). Associations of body habitus with blood pressure do not vary across obese and lean population. *Am J Hum Biol* 10: 120.
- Crews DE, Mancilha-Carvalho JJ (1991). Correlates of blood pressure in Yanomami Indians of northwestern Brazil. *Ethnic Dis* 3: 362-371.
- Crews DE, Harper GJ (1998). Renin ANP and ACE polymorphisms, blood pressure, and age in American Samoans: Preliminary data. *Am J Hum Biol* 10: 439-449.

- Crews DE, Williams SR (1999). Molecular Aspects of Blood Pressure Regulation. *Human Biol* 71: 475-503.
- Curnow KM (1996). Human type-1 angiotensin II (AT1) receptor gene structure and function. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 1996 3: S67-S73.
- Curnow KM, Pascoe L, White PC (1992). Genetic analysis of the human type-1 angiotensin II receptor. *Mol Endocrinol* 6: 1113-1118.
- Daniel HI, Munroe PB, Lawson M, Fogarty P, Kamdar SM, Caulfield MJ (1994). Investigation of the renin gene as a putative locus for essential hypertension (EH) in Vincentian African Caribbeans. *J Hum Hypertens* 8: 609-610.
- Danilov SM, Faerman AJ, Printseva OY, Martinov AV, Sckharov IYU, Trakht IN (1987). Immunohistochemical study of angiotensin converting enzyme in human tissues using monoclonal antibodies. *Histochemistry* 87: 487-490.
- Danser AH, Derkx FH, Hense HW, Jeunemaitre X, Riegger GA, Schunker H (1998). Angiotensinogen (M235) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphism in association with plasma renin and prorenin levels. *J Hypertens* 16: 1879-1883.
- Defendini R, Zimmerman EA, Weare JA, Alhenc-Gelas F, Erdos EG (1983). Angiotensin converting enzyme in epithelial and neuroepithelial cells. *Neuroendocrinology* 37: 32-40.
- Denton D, Weisinger R, Mundy Ni, Wickings EJ, Dixon A, Moisson P (1995). The effect of increased salt intake on blood pressure of chimpanzees. *Nat Med* 1: 1009-1016.
- División Garrote JA (1998). Medidas repetidas de presión arterial de forma semiautomática en el diagnóstico de la Hipertensión Arterial. Comparación con otros métodos diagnósticos y estudio de su variabilidad y reproducibilidad. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Medicina. Madrid.
- Don BR, Biglieri EG, Schambelan M (1997). Endocrine hypertension. En: Greenspan FS y Strewler G.J, eds. Basic and Clinical Endocrinology. Appleton y Lange. Stamford CT; pp. 359-380.
- Doria A, Onuma T, Gearin G, Freire MBS, Warram JH, Krolewski AS (1996). Angiotensinogen polymorphism M235, hypertension, and nephropathy in insulin-dependent diabetes. *Hypertension* 27: 1134-1139.
- Dresler WW (1996). Hypertension in the African American community: social, cultural and psychological factors. *Sem Nephrol* 16: 71-82.
- Drury PL (1983). Diabetes and arterial hypertension. *Diabetologica* 24: 1-9.
- Du Y, Guo DF, Iragami T, Speth RC, Wang DH (1996). Regulation of ANG II receptor subtype and its gene expression in adrenal gland. *Am J Physiol* 271: H440-H446.
- Duru K, Farrow S, Wang JM, Lockette W, Kurtz T (1994). Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 7: 759-762.
- Dzida G (1996). Restriction fragment length polymorphisms length polymorphisms of the human renin gene in essential hypertension. *Pol Arch Med Wewn* 96: 105-110.
- Eggena P, Sowers J, Maxwell MH, Barret JD, Bolulb MS (1991). Hormonal correlates of weight loss associate with blood pressure reduction. *Clin Exp Hypertens* 13: 1447-1456.
- Engeli S, Sharma AM (2000). Role of adipose tissue for cardiovascular-renal regulation in health and disease. *Horm Metab Res* 32: 485-499

- Erdos EG (1990). Angiotensin I-converting-enzyme gene and the changes in our concepts throughout the years. *Hypertension* 16: 363-370.
- Feinleib M, Garrison RJ, Fabstz R, Christian JC, Hrubec Z, Borhani NO, Kannel WB, Roseman R, Schwartz JT, Wagner JO (1977). The NHLBI twin study of cardiovascular disease risk factors: methodology and summary results. *Am J Epidemiol* 106: 284-285.
- Fernández-Llama P (1996). Estudio de los polimorfismos del gen del angiotensinógeno y del gen de la enzima de conversión de la angiotensina en la hipertensión esencial arterial y la nefroangiosclerosis. Tesis Doctoral, Universidad de Barcelona, Departamento de Medicina. Barcelona.
- Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert. L (1998). Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphism in essential hypertension. Relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 11: 439-444.
- Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Sierra A, Revert. L. Rivera F, Darnell A (1999). Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertensión arterial esencial. *Med Clin (Barc)* 112: 561-564.
- Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E (1995). Variation of the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet* 96: 295-300.
- Fornage M, Amos CI, Kardia S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E (1998). Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. *Circulation* 97: 1773-1779.
- Forrester T, Mc Farlane-Anderson N, Bennet F, Wilks R, Puras A, Cooper R, Rotimi C, Duru K, Tewksbury D, Morrison L (1996). Angiotensinogen and blood pressure among blacks: findings from a community survey in Jamaica. *J Hypertens* 14: 315-321.
- Forrester T, Mc Farlane-Anderson N, Bennet F, Wilks R, Cooper R, Rotimi C, Ward R (1997). The I/D polymorphism of the ACE gene, serum ace activity and blood pressure in Jamaicans. *Am J Hypertens* 10: 519-524.
- Frederich RC, Kahn BB, Peach MJ, Flier JS (1992). Tissue-specific nutritional regulation of angiotensinogen in adipose tissue. *Hypertension* 19: 339-344.
- Frossard PM, Lestringant GG, Hughes PF (1995). Correlations between RFLPs of the human renin gene locus and clinical variables of blood pressure regulation. *Biogenic Amines* 11: 313-324.
- Frossard PM, Lestringant GG, Elshahat YI, John A, Obineche EN (1998). An Mbol two - allele polymorphism may implicate the human renin gene in primary hypertension. *Hypertens Res* 21: 221-225.
- Frossard PM, Lestringant GC, Malloy MJ, Kane JP (1999). Human renin gene Bgl I dimorphism associated with hypertension in two independent populations. *Clin Genet* 56: 428-433.
- Funder JW, Pearce PT, Smith R, Smith AI (1988). Mineralocorticoid action: target tissue specificity is enzyme, not receptor, mediated. *Science* 242: 583-585.
- Gailard I, Clauser E, Corvol P (1989). Structure of the human angiotensinogen gen. *DNA* 8: 87-99.
- Gainer JV, Hunley TE, Kon V, Nadeau JH, Muldowney JA, Brown NJ (1997). Angiotensin II Type 1-receptor polymorphisms in African American lower frequency of the C1166 variant. *Biochem Mol Biol Int* 43: 227-231.

- Gamba G, Miyanoshita A, Lombardi M, Lytton J, Lee WS, Hediger MA, Herbert SC (1994). Molecular cloning, primary structure and characterization of two members of the mammalian electroneutral sodium-(potassium)-chloride cotransporter family expressed in kidney. *J Biol Chem* 269: 17713-17722.
- Gambaro G, Anglani F, D'Angelo A (2000). Association studies of genetics polymorphisms and complex disease. *Lancet* 355: 308-311.
- Garbers DL, Dubois SK (1999). The molecular basis of hypertension. *Annu. Rev Biochem* 68: 127-155.
- Gardes J, Bouhnik J, Clauser E, Corvol P, Menard J (1982). Role of angiotensinogen in blood pressure homeostasis. *Hypertension* 4: 185-189.
- Gasparo M, Bottari S, Levens NR (1995). Characteristics of angiotensin II receptors and their role in cell and organ physiology. En Larragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, diagnosis and management*. Raven press, New York; pp. 1695-1720.
- Geller DS, Farhi A, Pinkerton N, Fradley M, Moritz M, Spitzer A, Meinke G, Tsai FT, Sigler PB, Lifton RP (2000). Activating mineralocorticoid receptor mutation in hypertension exacerbated by pregnancy. *Science* 289: 119-123.
- Gerber LM, Crews DE (1999). Evolutionary perspectives on chronic degenerative diseases. En: Trevathan WR, Smith EO y McKenna JJ, eds. *Evolutionary Medicine*. Oxford University Press, New York; pp. 443-469.
- Gimenez-Roqueplo AP, Célrier J, Schmid G, Corvol P, Jeunemaitre X (1998). Role of cysteine residues in human angiotensinogen. *J Biol Chem* 273: 34480-34487.
- Gimenez-Roqueplo AP, Leconte I, Cohen P, Simon D, Guyene TT, Célrier J, Pau B, Corvol P, Clauser E, Jeunemaitre X (1996). The natural mutation Y248C of human angiotensinogen leads to abnormal glycosylation and altered immunological recognition of the protein. *J Biol Chem* 271: 9838-9844.
- Giner V, Poch E, Bragulat E, Oriola J, González, Coca A, de la Sierra A (2000). Renin-Angiotensin system genetic polymorphism and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 35: 512-517.
- Gitelman HJ, Graham JB, Welt LG (1966). A new familial disorder by hypokalemia and hypomagnesemia. *Trans Assoc Am Physicians* 79: 221-235.
- Gómez-Angelats E, de la Sierra A, Enjuto M, Oriola J, Francino A, Poch E, Coca A (2000). Lack of association between ACE gene polymorphism and left ventricular hypertrophy in essential hypertension. *J Hum Hypertens* 14: 47-49.
- González-Huix F, Fernández-Real (2000). Obesidad abdominal: ¿es útil la relación cintura/cadera? *Med Clin (Barc)* 114: 417-418.
- Grady EF, Sechi LA, Griffin CA, Schambelan M, Kalinyak JE (1991). Expression of AT2 receptors in the developing rat fetus. *J Clin Invest* 88: 921-933.
- Gu XX, Spaepen M, Guo C, Fagard R, Amery A, Lijnen P, Cassiman JJ (1994). Lack of association between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens* 8: 683-685.
- Hamet P (1996). Environmentally regulated genes of hypertension. *Clin Exp Hypertens* 18: 267-278.
- Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Trenblay J (1998). Hypertension: Genetics and environment. *J Hypertens* 16: 397-418.

- Hamilton M, Pickering CW, Roberts JAF, Sowry GSC (1954a) The etiology of essential hypertension I. The arterial pressure in the general population. *Clin Sci* 13: 11-35.
- Hamilton M, Pickering CW, Roberts JAF, Sowry GSC (1954b) The etiology of essential hypertension II Scores for arterial blood pressure adjusted for differences on age and sex. *Clin Sci* 13: 37-49.
- Hamilton M, Pickering CW, Roberts JAF, Sowry GSC (1954c) The etiology of essential hypertension IV. The role of inheritance. *Clin Sci* 13: 272-304.
- Hansson JH, Nelson-Williams C, Suzuki H, Schild L, Shimkets R, Lu Y, Canessa C, Iwasaki T, Rossier B, Lifton RP (1995a). Hypertension caused by a truncated epithelial sodium channel gamma subunit: genetic heterogeneity of Liddle syndrome. *Nat Genet* 11: 76-82.
- Hansson JH, Schild L, Lu Y, Wilson TA, Gautschi I, Shimkets R, Nelson-Williams C, Rossier BC, Lifton RP (1995b). A *de novo* missense mutation of the beta subunit of the epithelial sodium channel causes hypertension and Liddle syndrome, identifying a proline-rich segment critical for regulation of channel activity. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 11495-11499.
- Hardman JA, Hort YJ, Cantazaro DF, Tellam JT, Baxter JD, Morris BJ, Shine J (1984). Primary structure of human renin gene. *DNA* 3: 457-468.
- Harper GJ, Crews DE, Wood JW (1994). Lack of age-related blood pressure increased in the Gainj, Papua New Guinea: another low blood pressure population. *Am J Hum Biol* 6: 121-122.
- Harrap SB, Davidson HR, Connor JM, Soubrier F, Corvol P, Fraser R, Foy CJ, Watt GC (1993). The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 21: 455-460.
- Hata A, Namikawa C, Sasaki M, Sato K, Nakamura T, Tamura K (1994). Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin invest* 93: 1285-1287.
- Haynes WG, Noon JP, Walker BR, Webb DJ (1993). Inhibition of nitric oxide synthesis increased blood pressure in healthy humans. *J Hypertens* 11: 1375-1380.
- He J, Klag MJ, Appel LJ, Charleston J, Whelton PK (1999). The renin-angiotensin system and blood pressure. Differences between blacks and whites. *Am J Hypertens* 12: 555-562.
- Hegele Ra, Brunt JH, Connelly PW (1994). A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation* 90: 2207-2212.
- Henry JP, Cassel A (1969). Psychosocial factors in essential hypertension: Recent epidemiological and animal experimentation evidence. *Am J Epidemiol* 90: 171-200.
- Henry JP (1988). Stress and hypertension. *Soc Sci Med* 26: 293-302.
- Higaki J, Baba S, Katsuya T, Sato N, Ishikawa K, Mannami T, Ogata J, Ogihara T (2000). Deletion allele of angiotensin- converting enzyme gene increased risk of essential hypertension in Japanese men: the Suita study. *Circulation* 101: 2060-2065.
- Higasmori K, Zao Y, Higaki J, Kamitani A, Katsuya T, Nakura J, Miki T, Mikami H, Ogihara T (1993). Association analysis of a polymorphism of the ACE gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 191: 399-404.
- Hilbert P, Lindpaintner K, Beckman J, Serikawa T, Soubrier F, Dubay C, Cartwright P, De Gouyon B, Julier C, Takahasi S (1991). Chromosomal mapping of two genetic loci

- associated with blood pressure regulation in hereditary hypertensive rats. *Nature* 353: 521-526.
- Hingorani AD, Jia H, Stevens PA, Hooper R, Dickerson JEC, Brown MJ (1995). Renin-angiotensin system gene polymorphisms influence blood pressure and the response to ACE inhibition. *J Hypertens* 13:1602-1609.
- Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ (1996). Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 28: 907-911.
- Hiraga H, Oshima T, Watanabe M, Ishida T, Shingu T, Kambe M, Matsuura H, Kajiyama G (1996). Angiotensin-converting enzyme gene and salt sensitivity in essential hypertension. *Hypertension* 27: 569-572.
- Hoehle S, Blume A, Lebrun C, Culman J, Unger T (1995). Angiotensin receptors in the brain. *Pharmacol Toxicol* 77: 306-315.
- Hollenberg NK, Fisher ND, Price DA (1998). Pathways for angiotensin II generation in intact human tissue: evidence from comparative pharmacological interruption of the renin system. *Hypertension* 32: 387-392.
- Huang PL, Huang ZH, Mashimo H (1995). Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase. *Nature* 377: 239-242.
- Hubert C, Houot AM, Corvol P, Soubrier F (1991). Structure of the angiotensin I-converting enzyme gene. Two alternative promoters correspond to evolutionary steps of a duplicate gene. *J Biol Chem* 266: 15377-15383.
- Ignarro LJ (1996). Physiology and pathophysiology of nitric oxide. *Kidney Int* 55: S2-S5.
- Inoue I, Nakajima T, Williams CS, Quackenbush J, Puryear R, Powers M, Cheng T, Ludwig EH, Sharma AM, Hata A, Jeunemaitre X, Lalouel JM (1997). A nucleotide substitution in the promoter of human angiotensinogen is associated with essential hypertension and affects basal transcription. *J Clin Invest* 99: 1786-1797.
- Inoue I, Rohrwasser A, Helin C (1995). A mutation of angiotensinogen in a patient with preeclampsia leads to altered kinetics of the renin-angiotensin system. *Biol Chem* 270: 11430-11436.
- Intersalt Cooperative Research Group (1988). Intersalt: an international study of electrolyte excretion and blood pressure. Results for 24-hour urinary sodium and potassium excretion. *BJM* 297: 319-328.
- Ishigami T, Tamura K, Fujita T, Kobayashi I, Hibi K, Kihara M, Toya Y, Ociai H, Umemura S (1999). Angiotensinogen gene polymorphism near transcription start site and blood pressure. Role of a T to C transition at intron I. *Hypertension* 34: 430-434.
- Iwai N, Ohmichi N, Nakamura Y, Kinoshita M (1994). DD genotype of the angiotensin-converting-enzyme gene is a risk factor for left ventricular hypertrophy. *Circulation* 90: 2622-2628.
- Jáchimová M, Horký K, Bultas J, Kozik V, Jindra A, Peleska J, Martásek P (2001). Association of the Glu298Asp polymorphism in the endothelial nitric oxide synthase gene with essential hypertension resistant to conventional therapy. *Biochem Biophys Res Commun* 284: 426-430.
- James GD (1991). Blood pressure responses to the daily stressors of urban environments: Methodology, basic concepts and significance. *Phys Anthropol* 34:189-210.
- James GD, Pickering TG (1993). The influence of behavioral factors on the daily variation of blood pressure. *Am J Hypertens* 6: 170-174.
- James GD, Baker PT (1995). Human population biology and blood pressure: En Larrag J.H y Brenner B.H eds. Evolutionary and Ecological Considerations and Interpretations

- of Population Studies. Hypertension: pathophysiology, Diagnosis, and Management, 2ed. Raven Press, New York; pp. 115-126.
- Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM, Corvol P (1992a). Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 71: 169-180.
- Jeunemaitre X, Rigat B, Charru A, Houot AM, Soubrier F, Corvol P (1992b). Sib pair linkage analysis of renin gene haplotypes in human hypertension. *Hum Genet* 88: 301-306.
- Jeunemaitre X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM (1992c). Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nat Genet* 1: 72-75.
- Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F, Menard J, Corvol P (1993). M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens* 11: S80-S81.
- Jeunemaitre X, Ménard J, Clauser E, Corvol P (1995). Angiotensin molecular biology and genetics. En: Laragh JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press, New York; pp. 1653-1665.
- Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo A-P, Hata A, Corvol P, Lalouel J-M (1997). Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 60: 1448-1460.
- Jeunemaitre X, Giménez-Roqueplo A-P, Celerier J, Corvol P (1999). Angiotensinogen variants and human hypertension. *Cur Hypertens Rep* 1: 31-41.
- JNC VI (1997). Joint National Committee on Detection Evaluation and Treatment of High Blood Pressure: The sixth report of the JNC on detection, evaluation and treatment of high blood pressure. *Arch Int Med* 157: 2413-2446.
- Johnson, AG Simons LA, Friedlander Y, Simons J, David DR, MaCallum J (1996). M235→T polymorphism of the angiotensinogen gene predicts hypertension in elderly. *J Hypertens* 14: 1061-1065.
- Kageyama R, Ohkubo H, Nakanishi S (1984). Primary structure of human preangiotensinogen deduced from the cloned cDNA sequence. *Biochemistry* 23: 3603-3609.
- Kainulainen K, Perola M, Terwilliger J, Kaprio J, Kokenvuo M, Syvanen AC, Vartiainen E, Peltonen L, Kontula K (1999). Evidence for involvement of the type 1 angiotensin II receptor locus in essential hypertension. *Hypertension* 33: 844-849.
- Kamdar S, Daniel H, Fogarty P, Lawson M, Munroe P, Caulfield M (1994). ACE insertion deletion (I/D) polymorphism in Vincentian African Caribbean with essential hypertension. *J Human Hypertens* 8: 611-615.
- Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Mikami H, Miki T Ogihara T (1994). Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 8: 521-524.
- Kanai H, Matsuzawa Y, Kotani K, Keno P, Kobatake T, Nagai Y (1990). Close correlation of intraabdominal fat accumulation to hypertension in obese women. *Hypertension* 16: 484-490.
- Kannel WB (2000). Elevated blood pressure as a cardiovascular risk factor. *Am J Cardiol* 85: 251-255.
- Kannel WE, Wilson WF, Zhang TJ. (1991). The epidemiology of impaired glucose tolerance and hypertension. *Am Heart J* 121: 1268-1273.

- Kaprio J (2000). Genetic epidemiology. *BMJ* 320: 1257-1259.
- Karl M, Lamberts SW, Detera-Wadleigh SD, Encio IJ, Stratakis CA, Hurley DM, Accili D, Chrousos GP (1993). Familial glucocorticoid resistance by a splice site deletion in the human glucocorticoid receptor gene. *J Clin Endocrinol Metab* 76: 683-689.
- Kato N, Sugiyama T, Morita H, Yamori Y, Yakazaki Y (1999). Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: extensive association study and meta-analysis on six reported studies. *J Hypertens* 6: 757-763.
- Keavney B, McKenzie C, Parish S, Palmer A, Clark S, Youngman L, Delépine M, Lathrop M, Peto R, Collins R (2000). Large-scale test of hypothesised associations between the angiotensin-converting-enzyme insertion/deletion polymorphism and myocardial infarction in about 5000 cases and 6000 controls. *Lancet* 355: 434-442.
- Kew MC, Leckie BJ, Greef MC (1989). Arterial hypertension as a paraneoplastic phenomenon in a hepatocellular carcinoma. *Arch Intern Med* 149: 2111-2113.
- Kiema T-R, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesäniemi YA, Savolainen MJ (1996). Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 28: 1070-1075.
- Kim HS, Krege JH, Kluckman KD (1995). Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 92: 2735-2739.
- Kimura S, Mullins JJ, Bunneman B (1992). High blood pressure in transgenic mice carrying the rat angiotensinogen gene. *EMBO J* 11: 821-827.
- Kirby CR, Convertino VA (1986). Plasma aldosterone and sweat sodium concentrations after exercise and heat acclimation. *J Appl Physiol* 61: 967-970.
- Kojima S, Ineaga T, Matsuoka H, Kuramochi M, Omae T, Nara Y, Yamori Y (1994). The association between salt sensitivity of blood pressure and some polymorphic factors. *J Hypertens* 12: 797-801.
- Koppelman GH, Los H, Postma DS (1999). Genetics and environment in asthma: the answer of twin studies (editorial). *Eur Respir J* 13: 2-4.
- Kostis JB (1989). Angiotensin converting enzyme inhibitors. *Am J Hypertens* 2: 57-64.
- Kreutz R, Hubner N, Ganten D, Lindpaintner K (1995). Genetic linkage of the ACE gene to plasma angiotensin I-converting enzyme activity but not to blood pressure. *Circulation* 92: 2381-2384.
- Krizanová O, Obdržálková D, Poláková H, Jelok I, Hudecová S (1997). Molecular variants of renin-angiotensin system components in the Slovak population. *Physiol Res* 46: 357-361.
- Kunkel LM, Tantravahi U, Eisenhardt M, Latti SA (1982). Regional localization on the human X of DNA segments cloned from flow sorted chromosomes. *Nucl Acids Res* 10:1557-1578.
- Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM (1997). Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites. A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 30: 1331-1337.
- Lacolle Y P, Gautier S, Poirier O, Pannier B, Cambien F, Benetos A (1997). Nitric oxide synthase gene polymorphism blood pressure and aortic stiffness in normotensive and hypertensive subjects. *J Hypertens* 16: 31-35.
- Lalouel JM, Rohrwasser A, Terreros D, Morgan T, Ward K (2001). Angiotensinogen in essential hypertension: from genetics to nephrology. *J Am Soc Nephrol* 12: 606-615.

- Lifton RP (1996). Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 272: 676-680.
- Lifton RP, Dluhy RG, Powers M, Rich GM, Gutkin M, Fallo F, Gill JR Jr, Feld L, Ganguly A, Laidlaw JC (1992). Hereditary hypertension caused by chimaeric gene duplication and ectopic expression of aldosterone synthase. *Nature Genet* 2: 66-74.
- Lifton RP, Gharavi AG, Geller DS (2001). Molecular mechanisms of human hypertension. *Cell* 104: 545-556.
- Lindpaintner K, Pfefer MA, Kreutz R, Stampfer MJ, Grodstein F, LaMotte F, Buring J, Hennekens CH (1995). A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 332: 706-711.
- Litchfield WR, Dluhy RG, Lifton RP, Rich GM (1995). Glucocorticoid-remediable aldosteronism. *Compr Ther* 21: 553-558.
- Liyoun N, Davis D, James K, Simons L, Friedlander Y, Simons J, McCallum J, Johnson A (1999). The A1166C mutation in the angiotensin II type 1 receptor and hypertension in the elderly. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 26: 525-526.
- Luft FC (1998). Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens* 16: 1871-1878.
- Luft FC (2000). Molecular genetics of human hypertension. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 9: 259-266.
- Maguchi M, Kohara K, Okura T, Li S, Takezaki M, Nishida W (1996). Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in essential hypertension patients in Japanese populations. *Angiology* 47: 643-648.
- Martín-Peña G (1994). La medida de la masa magra En: La obesidad. Sociedad Española de Endocrinología, Madrid; pp. 13-15.
- Martínez E, Puras A, Escibano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, JA Divisson, Vidal A, Fernández JA (2000). Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 14: 131-135.
- Martínez E, Puras A, Escibano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, JA Divison, Fernández JA (2002). Threonines at position 174 and 235 of the angiotensinogen polypeptide chain are related to familial history of hypertension in a Spanish-Mediterranean population. *Br J Biomed Sci* (en prensa).
- Mastana S, Nunn J (1997). Angiotensin converting enzyme deletion polymorphism is associated with hypertension in a Sikh population. *Hum Hered* 47: 250-253.
- Mattu RK, Needham EWA, Galton DJ, Frangos E, Clark AJL, Caulfield M (1995). A DNA variant in the angiotensin-converting enzyme gene locus associates with coronary artery disease in the Caerphilly Heart Study. *Circulation* 91: 270-274.
- Menard J, El-Amrani AK, Savoie F, Bouhnik J (1991). Angiotensinogen: an attractive and underrated participant in hypertension and inflammation. *Hypertension* 18: 705-706.
- Mercure C, Thibault G, Lussier-Cacan S, Davignon J, Schiffrin E, Reudelhuber TL (1995). Molecular analysis of human prorenin prosegment variants *in vitro* and *in vivo*. *J Biol Chem* 270: 16355-16359.
- Miall WE (1956). Follow up study of arterial pressure in the population of a Welsh mining valley. *Br Med J* 11: 1204-1208.
- Miall WE, Oldham PD (1958). Factors influencing arterial blood pressure in the general population. *Clin Sci* 17: 409-444.

- Miall WE, Heneage P, Khosal T, Lowell HG, Moore P (1967). Factors influencing the degree of resemblance in arterial pressure of close relatives. *Clin Sci* 33: 271-283.
- Miller JA, Thai K, Scholey JW (1999). Angiotensin II Type 1 receptor gene polymorphism predicts response to losartan and angiotensin II. *Kidney Int* 56: 2173-2180.
- Miyamoto Y, Yoshimasa, Itoh H, Igaki T, Harada M, Yamashita, Chun T, Doi K, Ishikawa M, Hori Y, Kuwahara K, Ogawa E, Inoue M, Masuda I, Saito I, Nakao K (1996). Association of angiotensin II type I receptor gene polymorphism with essential hypertension in Japanese. *J Hypertens* 14: S29.
- Miyamoto Y, Saito Y, Kajiyama N, Yoshimura M, Nakayama M, Kamitani S, Harada M, Ishikawa M, Kuwahara K, Ogawa E, Hamanaka I, Takahashi N, Kaneshige T, Teraoka H, Akamizu T, Azuma N, Yoshimasa Y, Yoshimasa T, Itoh H, Masuda I, Yasue H, Nakao K (1999). Endothelial constitutive nitric oxide synthase gene is positively associated with essential hypertension. *Hypertension* 32: 3-8.
- Mizuiiri S, Hemmi H, Kumanomidou H (1997) Decreased renal ACE mRNA levels in healthy subjects with II ACE genotype and diabetic nephropathy. *J Am Soc Nephrol* 8: 115A.
- Montgomery HE, Marshall R, Hemingway H, Myerson S (1998). Human gene and muscle performance. *Nature* 393: 221.
- Morgan L, Crawshaw S, Baker PN, Edwards R, Broughton Pipkin F, Kalsheker N (1997). Functional and genetics studies of the angiotensin II type I receptor in pre-eclamptic and normotensive women. *J Hypertens* 15: 1389-1396.
- Morganini JB (1761). De sedibus et causis Morboreum per Anatomicum Indagatis. Remondiana. Venice.
- Morise T, Takeuchi Y, Takeda R (1994a). Frequency of the renin gene restriction fragments length polymorphism in hypertensives with a genetic predisposition to hypertension. *Horm Res* 41: 218-221.
- Morise T, Takeuchi Y, Takeda R (1994b). Angiotensin-Converting enzyme polymorphism and essential hypertension. *Lancet* 343: 125.
- Morris BJ, Ghriiffiths LR (1988). Frequency in hypertensives of alleles for a RFLP associated with the rennin gene. *Biophys Res Commun* 50: 219-224.
- Morton N (1992). The future of genetic epidemiology. *Ann Medic* 24: 557-562.
- Moscowitz DW (1996). Hypertension, thermotolerance and the "African Gene": An hypothesis. *Clin Exp Hypertens* 18: 1-19.
- Mune T, Rogerson FM, Nikkila H, Agawai AK, Withe PC (1995). Human hypertension caused by mutations in the kidney isozyme of 11 β -hydroxysteroid dehydrogenase. *Nat Genet* 10: 394-396.
- Murphy TJ, Alexander RW, Griendling KK, Runge MS, Bernstein KE (1991). Isolation of a cDNA encoding the vascular type-1 angiotensin II receptor. *Nature* 351: 233-236.
- Nadaud S, Bonnardeaux A, Lathrop GM, Soubrier F (1994). Gene structure, polymorphism and mapping of the human endothelial nitric oxide synthase gene. *Biochem Biophys Res Commun* 198: 1027-1033.
- Naftilan AJ, Williams R, Burt D, Paul M, Pratt RE, Hobart P, Chirgwin J, Dzau VJ (1989). A lack of genetics linkage of renin gene restriction fragment length polymorphisms with human hypertension. *Hypertension* 14: 614-618.
- Nakai K, Itoh C, Miura Y, Hotta K, Musha T, Itoh T, Miyakawa T, Iwasi R, Hiramori K (1994). Deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene is

- associated with serum ACE concentration and increased risk for CAD in the Japanese. *Circulation* 90: 2199-2202.
- Nakayama M, Yasue H, Yoshimura M, Shimasaki, Kugiyama K, Ogawa H, Motoyama T, Saito Y, Ogawa Y, Miyamoto Y, Nakao K (1999). T→C mutation in the 5'-flanking region of the endothelial nitric oxide synthase gene is associated with coronary spasm. *Circulation* 99: 2864-2870.
- Nava E, Lusher TF (1995). Endothelium-derived vasoactive factors in hypertension: Nitric oxide and endothelin. *J Hypertens* 13: 539-548.
- Nava E, Wiklund NP, Salazar FJ (1996). Changes in nitric oxide release *in vivo* in response to vasoactive substances. *Br J Pharmacol* 119: 1211-1216.
- Nielsen S, Jensen MD (1997). Obesity and cardiovascular. *Curr Opin Lipidol* 8: 200-204.
- Niimura F, Labosky PA, Kakuchi J, Okubo S, Yoshida H, Oikawa T, Ichiki T, Naftilan AJ, Fogo A, Inagami T (1995). Gene targeting in mice reveals a requirement for angiotensinogen in the development and maintenance of kidney morphology and growth factor regulation. *J Clin Invest* 96: 2947-2954.
- Nishiuma S, Kario K, Kayaba K, Nagio N, Shimada K, Matsuo T, Matsuo M (1995). Effect of the angiotensinogen gene Met235Thr variant on blood pressure and other cardiovascular risk factors in two Japanese populations. *J Hypertens* 13: 717-722.
- Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Wang J, Faug Z, Schmitz C, Zhao J, Rao VS, Lindpaintner K (1998). Angiotensinogen gene and hypertension in Chinese. *J Clin Invest* 101: 188-194.
- Niu T, Yang J, Wang B, Chen W, Wang Z, Laird N, Wei E, Fang Z, Lindpaintner K, Rogus JJ, Xu X (1999). Angiotensinogen gene polymorphism M235T/T174M. No excess transmission to hypertensive Chinese. *Hypertension* 33: 698-702.
- Node K, Kitakaze M, Yoshikawa H, Kosaka H, Hori M (1997). Reduced plasma concentrations of nitric oxide in individuals with essential hypertension. *Hypertension* 30: 405-408.
- O'Byrne S, Caulfield M (1998). Genetics of hypertension. Therapeutic implications. *Drugs* 56: 203-214.
- O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, Myers RH, Levy D (1998). Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 12: 1766-1772.
- O'Rourke, MF (1990). What is blood pressure? *Am J Hypertens* 3: 803-810.
- Okada N (1990). Transfer RNA-like structure of the human Alu family: implications of this generation mechanism and possible function. *J Molec Evolution* 31: 500-510.
- Okura T, Kitami Y, Hiwada K (1993). Restriction fragment length polymorphisms of the human renin gene: association study with a family history of essential hypertension. *J Hum Hypertens* 7: 457-461.
- Okura T, Kitami Y, Wakamiya R, Iwata T, Hiwada K (1992). Renin gene restriction fragment length polymorphisms in a Japanese family with a high incidence of essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 17-19.
- OMS (1978). Hipertensión Arterial. Informe técnico n° 628. Ginebra.
- Owens GK, Rabinowitch PS, Schwath SM (1981). Smooth muscle cell hypertrophy versus hyperplasia in hypertension. *Proc Natl Acad Sci USA* 78: 7759-7763.

- Oya M (1998). HDL-cholesterol and cardiovascular mortality in Spain. *Rev Esp Cardiol* 51: 988-990.
- Paillard F, Chansel D, Brand E, Benetos A, Thomas F, Czekalski S, Ardallou R, Soubrier F (1999). Genotype-phenotype relationships for the renin-angiotensin-aldosterone system in a normal population. *Hypertension* 34: 423-429.
- Pamies Andreu E, Palmero Palmero C, García Lozano R, Stiefel García Junco, Miranda Guisado ML, Martín Sanz V, Villar Ortiz J, Núñez Roldán A, Cameado de la Fuente J (1999). Influencia de los polimorfismos M235T del angiotensinógeno e I/D de la enzima convertidora de la angiotensina sobre la hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovascular. *Medi Clin (Barc)* 113: 164-168.
- Pascoe L, Cumow KM, Slutsker L, Cornell JMC, Speiser PW, New MI (1992). Glucocorticoid-suppressible hyperaldosteronism. Results from hybrid genes created by unequal crossovers between CYP11b1 and CYP11b2. *Proc Natl Acad Sci USA* 89: 8327-8331.
- Pickering G (1967). The inheritance of arterial pressure. En Stamler J, Stamler R, Pullman TN, eds. *The Epidemiology of Hypertension*. Grune & Stratton, New York; pp. 18-27.
- Pickering G, James GD, Boddie C, Harshfield GA, Blank S, Laragh JH (1988). How common is white coat hypertension? *JAMA* 259: 225-228.
- Platt R (1947). Heredity in hypertension. *Q J Med* 16: 111-132.
- Platt R (1967). The influence of heredity. En Stamler J, Stamler R, Pullman TN, eds. *The Epidemiology of Hypertension*. Grune & Stratton, New York; pp. 9-17.
- Poch E, Fernández-Llama P, Botey A (1997). Polimorfismos del gen de la enzima de conversión de la angiotensina en la hipertensión arterial. *Hipertensión* 14: 297-301.
- Poch E, de la Sierra A, González-Núñez D, Oriola J, Redón J, Chaves FJ, Marín P, Giner V, Pamies E, Villar J, Ramírez R, Stiefel P, Rodríguez Pérez JC, Rodríguez Esparragón F, Martínez E, Carrión L, Sanchis C, Divisón JA. (2001). Polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina e hipertensión arterial esencial. Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial. *Med Clin (Barc)* (en prensa).
- Poirier O, Georges JL, Ricard S, Arveiler D, Ruidavets JB, Luc G, Evans A, Cambien F, Tiret L (1998). New polymorphism of the angiotensin II type 1 receptor polymorphisms and their associations with myocardial infarction and blood pressure: the ECTIM study. Etude Cas-Témoin de L'Infarctus du Myocarde. *J Hypertens* 16: 1143-1147.
- Poirier O, Mao C, Mallet C, Nicaud V, Herrmann SM, Evans A, Ruidavets JB, Arveiler D, Luc G, Tiret L, Soubrier F, Cambien F (1999). Polymorphism of the endothelial nitric oxide synthase gene no consistent association with myocardial infarction in the ECTIM study. *Eur J Clin Invest* 29: 284-290.
- Popov V, Formichea E, Kovalev J, Schwartz E (1996). Absence of association between the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and borderline hypertension in men of St. Petersburg, Russia. *J Hum Hypertens* 10: 557-559.
- Pravanec M, Simonet L, Kren V, Levan G, Szpirer J, Kurtz T (1991). The rat renin gene: assignment to chromosome 13 and linkage to the regulation of blood pressure. *Genomics* 9: 466-472.
- Puras A, Sanchis C, Artigao LM, Divison JA (1998). Prevalence, awards, treatments and control of hypertension in Spanish population. *Eur J Epidemiol* 14: 31-36.
- Raj L (2001). Hypertension and cardiovascular risk factors. Role of the angiotensin II-nitric oxide interaction. *Hypertension* 37: 767-773.

- Rankinen T, Gagnon J, Pérusse L, Rice T, Leon AS, Skinner JS, Wimore IH, Rao DC, Bouchard C (1999). Body fat, resting and exercise blood pressure and the angiotensinogen M235T polymorphism: the heritage family study. *Obes Res* 7: 423-430.
- Rapp JH, Wang SM, Dene H (1989). A genetic polymorphism in the renin gene of Dahl rats cosegregate with blood pressure. *Science* 243: 542-544.
- Raynolds MV, Bristow MR, Bush EW, Abraham WT, Lowes BD, Zisman LS, Taft CS, Perryman MB (1993). Angiotensin converting enzyme DD genotype in patients with ischemic or idiopathic dilated cardiomyopathy. *Lancet* 342: 1073-1075.
- Redón J, Chaves FJ, Liao Y, Pascual JM, Rovira E, Armengod ME, Cooper RS (2000). Influence of the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene on the outcome of microalbuminuria in essential hypertension. *Hypertension* 35: 490-495.
- Reid IA, Morris BJ, Ganong WG (1978). The renin-angiotensin system. *Annu Rev Physiol* 40: 377-410.
- Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F (1990). An insertion/deletion in the angiotensin I-converting enzyme accounting for half the evidence of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 86: 1343-1346.
- Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragon FJ, Hernández-Perrera O, Fiuza-Pérez MD, Anabitarte-Prieto, Losada-Cabrera A (2000). Effects of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variants on blood pressure and other vascular risk factors in a Spanish population. *J Hum Hypertens* 14: 789-793.
- Ronday MJH, Van der Lelij A, Wienesen M, Rothova A, Stilma JS, Kijlstra A (1996). Elevated serum angiotensin-converting enzyme activity in onchocerciasis. *Lung* 174: 393-395.
- Rose G, Stamler J (1989). The INTERSALT study: Background, methods, and main results. *J Hum Hypertens* 3: 283-288.
- Rotimi C, Morrison L, Cooper R, Oyejide C, Effiong E, Ladipo M, Osotemihen B, Ward R (1994). Angiotensinogen gene in human hypertension. Lack of an association of the 235T allele among African Americans. *Hypertension* 24: 591-594.
- Rotimi C, Puras A, Cooper R, Anderson M, Forrester T, Ogumbiyi O, Morrison L, Ward R (1996). Polymorphisms of the renin-angiotensinogen genes among Nigerians, Jamaicans and African Americans. *Hypertension* 27: 558-563.
- Rotimi C, Cooper R, Ogumbiyi O, Morrison L, Ladipo M, Tewksbury D, Ward R (1997). Hypertension, serum angiotensinogen, and molecular variants of the angiotensinogen gene among Nigerians. *Circulation* 95: 2348-2350.
- Rutledge DR, Browe CS, Kubilis PS, Ross EA (1994). Analysis of two variants of the angiotensinogen gene in essential hypertensive African-Americans. *Am J Hypertens* 7: 651-654.
- Sacks FM, Svetkey LP, Vollmer WM, Appel LJ, Bray GA, Harsha D, Obarzanek E, Conlin PR, Miller ER, Simons-Morton DG, Karanja N, Lin PH, for the DASH-Sodium Collaborative Research Group (2001). Effects on blood pressure of reduced dietary sodium and the dietary approaches to stop hypertension (DASH) diet. *N Engl J Med* 344: 3-10.
- Salveti A (1990). Newer ACE inhibitors: A look at the future. *Drugs* 40: 800-828.
- Samani NJ, Thompson JR, O'Toole L, Channer K, Woods KL (1996). A meta-analysis of the association of the deletion allele of the angiotensin-converting-enzyme gene with myocardial infarction. *Circulation* 94: 708-712.

- Sambrook J, Fritsch EF, Maniatis T (1989). Molecular cloning. A laboratory manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York.
- Sanchis Domenech C (1998) Epidemiología de la hipertensión arterial en población general de Albacete: prevalencia, conocimiento, tratamiento y control. Tesis Doctoral, Universidad Autónoma de Madrid, Departamento de Medicina. Madrid.
- Sato N, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T, Higaki J, Ohigara T (1997). Associations of variants in critical core promoter element of angiotensinogen risk of essential-hypertension in Japanese. *Hypertension* 30: 321-325.
- Schmidt M, Watson L, Duncan B, Metcall P, Brancati FK, Sharret RA, Davis CE, Heiss G (1996). Clustering of dyslipidemia, hyperuricemia, diabetes, and hypertension and association with fasting insulin and central and overall obesity in a general population. Atherosclerosis risk in communities study investigators. *Metabolism* 45: 699-706.
- Schmidt S, Beige J, Walla-Friedel M, Michel MC, Sharma AM, Ritz E (1997). A polymorphism in the gene for the angiotensin II type 1 receptor is not associated with Hypertension. *J Hypertens* 15: 1385-1388.
- Schorr U, Blaschke K, Beige J, Distler A, Sharma AM (1999). Angiotensinogen M235T variant and salt sensitivity in young normotensive Caucasians *J Hypertens* 17: 475-479.
- Schunkert H, Dzau VJ, Tang SS (1990). Increased rat cardiac angiotensin converting enzyme and mRNA expression in pressure overload left ventricular hypertrophy: effects on coronary resistance, contractility and relaxation. *J Clin Invest* 86: 1913-1920.
- Schunkert H, Hense HW, Holmer SR, Stender M, Perz S, Keil U, Lorell BH, Riegger GAJ (1994). Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Eng J Med* 330: 1634-1638.
- SEEDO (2000). Consenso SEEDO'2000 para la evaluación del sobrepeso y la obesidad y el establecimiento de criterios de intervención terapéutica. Sociedad Española para el Estudio de la Obesidad (SEEDO). *Med Clin (Barc)* 115: 587-597.
- Shapiro R, Holmquist B, Riordan JF (1983). Anion activation of angiotensin converting enzyme: dependence of nature of substrate. *Biochemistry* 22: 3850-3857.
- Shinkets RA, Warnock DG, Bositis CM, Nelson-Williams C, Hansson JH, Schambelan M, Gill JR Jr, Ulick S, Milora RV, Findling JW (1994). Liddle's syndrome: heritable human hypertension caused by mutations in the beta subunit of the epithelial sodium channel. *Cell* 79: 407-414.
- Silva HP, Crews DE, Neves WA (1995). Subsistence patterns and blood pressure variations in two rural Caboclo communities of Marajo, Para, Brazil. *Am J Hum Biol* 7: 535-542.
- Simon DB, Nelson-Williams C, Bia MJ, Ellison D, Karret FE, Molina AM, Vaara I, Iwata F, Cushner HM, Koolen M, Gainza FJ, Gitelman HJ, Lifton RP (1996). Gitelman's variant of Bartter's syndrome, inherited hypokalaemic alkalosis, is caused by mutations in the thiazide-sensitive Na-Cl cotransporter. *Nat Genet* 12: 24-30.
- Sing CB, Haviland MB, Reilly SL (1996). Genetics architecture of common multifactorial diseases. En: Chadwick D, Cardew G, eds. Variation in the human genome. John Wiley & Sons, Chichester, pp. 211-232.
- Sinnett D, Richer C, Deragon JM, Labuda D (1991). Alu RNA secondary structure consists of two independent 7 SL RNA-like folding units. *J Biol Chem* 266: 8675-8678.

- Soubrier F, Jeunemaitre X, Rigat B, Houot AM, Cambien F, Corvol P (1990). Similar frequencies of renin gene restriction fragment length polymorphism in hypertensive and normotensive subjects. *Hypertension* 16: 712-717.
- Soubrier F, Hubert C, Testud P, Nadaud S, Alhenc-Gelas F, Corvol P (1993). Molecular biology of the angiotensinogen I converting enzyme I: Biochemistry and structure of the gene. *J Hypertens* 11: 471-476.
- Spiegelman D, Israel RG, Bouchard C, Willet WC (1992). Absolute fat mass, percent body fat, and body-fat distribution, which is the real determinant of blood pressure and serum glucose. *Am J Clin Nutr* 55: 1033-1044.
- Staessen JA, Wang JG, Ginocchio G, Petrov V, Saavedra AP, Soubrier F, Vlietinck R, Fagard R (1997). The deletion/insertion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 15:1579-1592.
- Staessen JA, Kuznetsova T, Wang JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fargard R (1999). M235T angiotensinogen polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 17: 9-17.
- Staessen JA, Wang J-G, Brand E, Barlassina C, Birkenhäger WH, Herrmann S-M, Fagard R, Tizzoni L, Bianchi G (2001). Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens* 19:1349-1358.
- Steigerwalt S (1995). Unraveling the causes of hypertension and hypokalemia. *Hosp Pract* 15: 67-79.
- Stewart PM, Wallace AM, Valentino R, Burt D, Shackleton CH, Edwards CR (1987). Mineralocorticoid activity of liquorice: 11-beta-hydroxysteroid dehydrogenase deficiency comes of age. *Lancet* 2: 821-824.
- Strautnieks SS, Thompson RJ, Hanukoglu A, Dillon MJ, Hanukoglu I, Kuhnle U, Seckl J, Gardiner RM, Chung E (1996). Localisation of pseudoaldosteronism genes to chromosome 16p12.2-13.11 and 12p13.1-pter by homozygosity mapping. *Hum Mol Genet* 5: 293-299.
- Stroth U, Unger T (1999). The renin-angiotensin system and its receptors. *J Cardiovasc Pharmacol* 33: S21-S28.
- Summers C, Tang W, Zelezná B, Raizada MK (1991). Angiotensin II receptors subtypes are coupled with distinct signal-transduction mechanism in neurons and astrocytes from rat brain. *Proc Natl Acad Sci USA* 88: 7567-7571.
- Sutherland DJ, Ruse JL, Laidlow JC (1966). Hypertension, increased aldosterone secretion and low plasma renin activity relieved by dexamethasone. *Can Med Assoc J* 95: 1109-1119.
- Swartz SL, Williams GH, Hollenberg NK, Moore TJ, Dluhy RG (1979). Converting enzyme inhibition in essential hypertension: The hypertensive response does not reflect only reduced angiotensin II formation. *Hypertension* 1: 106-111.
- Takami S, Katsuya T, Rakugi H, Sato N, Nakata Y, Kamitani A, Miki T, Higaki J, Ohigara T (1998). Angiotensin II type I receptor gene polymorphism is associated with increased of left ventricular mass but not with hypertension. *Am J Hypertens* 11: 316-321.
- Takayanagi R, Ohnaka K, Sakai Y, Nakao R, Yanase T, Haji M, Inagami T, Furuta H, Gou D-F, Nakamura M, Nawata H (1992). Molecular cloning, sequence analysis and expression of a cDNA encoding human type-1 angiotensin II receptor. *Biochem Biophys Res Commun* 183: 910-916.

- Tamura K, Umemura S, Iwamoto T, Yamaguchi S, Kobayashi S, Takeda K, Tokita Y, Takagi N, Murakami K, Fukamizu A (1994). Molecular mechanism of adipogenic activation of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 23: 364-368.
- Tamura K, Umemura S, Yamakawa T, Nyui K, Hibi K, Watanabe Y, Ishigami T, Yabana M, Tanaka S, Sekihara H, Murakami K, Ishii M (1997). Modulation of tissue angiotensinogen gene expression in genetically obese hypertensive rats. *Am J Physiol* 272: R1704-11.
- Tang J, Wong RN (1987). Evolution in the structure and function of aspartic proteases. *J Cell Biochem* 33: 53-63.
- Terwilliger JD, Weis KM (1998). Linkage disequilibrium mapping of complex disease: fantasy or reality? *Curr Opin Biotechnol* 9: 578-594.
- Tewksbury DA (1990). Angiotensinogen: biochemistry and molecular biology. In Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press, New York; pp. 1197-1216.
- Tewsbury DA, Frome WL, Dumas ML (1978). Characterization of human angiotensinogen. *J Biol Chem* 253:11, 3817-3820.
- Tewsbury DA (1983). Angiotensinogen. *Fed Proc* 42: 2724-2728.
- Thomas GN, Young Rp, Tomlison B, Woo KS, Sanderson JE, Critcheley JA (2000). Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms and hypertension in Hong Kong Chinese. *Clin Exp Hypertens* 22: 87-97.
- Thomas GN, Tomlison B, Chan JC, Sanderson JE, Cockram CS, Critcheley JA (2001). Renin-angiotensin-aldosterone system gene polymorphisms, blood pressure, dyslipidemia, and diabetes in Hong Kong Chinese: a significant association of the ACE insertion/deletion polymorphism with type 2 diabetes. *Diabetes Care* 24: 356-361.
- Thomas GD, Zhang W, Victor RG (2001). Nitric oxide deficiency as a cause of clinical hypertension. Promising new drug targets for refractory hypertension. *JAMA* 285: 2055-2057.
- Tiret L, Rigat B, Visvikis S, Breda C, Corvol P, Cambien F, Soubrier F (1992). Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Human Genet* 51: 197-205.
- Tiret L, Kee F, Poirier O, Nicaud V, Lecerf L, Evans A, Cambou J, Arveiler D, Luc G, Amoyuel P, Cambien F (1993). Deletion polymorphism in angiotensin-converting enzyme gene associated with parental history of myocardial infarction. *Lancet* 341: 991-992.
- Tiret L, Sylvain R, Poirier O, Arveiler D, Cambou J-P, Luc G, Evans A, Nicaud V, Cambien F (1995). Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and myocardial infarction: the ECTIM study. *J Hypertens* 13: 311-317.
- Tiret L, Blanc H, Ruidaverts JB, Arveiler D, Luc G, Jeunemaitre X, Tichet J, Mallet C, Poirier O, Plouin PF, Cambien F (1998). Gene polymorphism of the renin-angiotensin system in relation to hypertension and parental history of myocardial infarction and stroke: the PEGASE study. *Projet d'Etude des Genes de l'Hypertension Arterielle Severe a Moderee Essentielle. J Hypertens* 16: 37-44.
- Tsukada T, Tokoyama K, Arai T, Takemoto F, Hara S, Yamada A, Kawaguchi Y, Hosoya T, Igaro J (1998). Evidence of association of the eNOS gene polymorphism with plasma NO metabolite levels in humans. *Biochem Biophys Res Commun* 245: 190-193.

- Ueno N, Yoshida N Hirose S, Yokoyama H, Uehara H, Murakami K (1984). Angiotensinogen producing hepatocellular carcinoma. *Hypertension* 6: 931-933.
- Ulick S, Wang JZ, Blumenfeld JD, Pickering TG (1992). Cortisol inactivation overload: a mechanism of mineralocorticoid hypertension in the ectopic adrenocorticotropin syndrome. *J Clin Endocrinol Metab* 74: 963-967.
- Ullian ME, Linas SL (1989). Role of receptor cycling in the regulation of angiotensin II surface receptor number and angiotensin II uptake in rat vascular smooth muscle. *J Clin Invest* 84: 840-846.
- Umemura S, Nyui N, Tamura K, Hibi K, Yamaguchi S, Nakamura M, Ishigami T, Yabana M, Kihara M, Inoue S, Ishii M (1997). Plasma angiotensinogen concentrations in obese patients. *Am J Hypertens* 10: 629-633.
- Unger T, Chung O, Ciskos T, Culman J, Gallinat S, Gohlke P, Hohle S, Meffert S, Stoll M, Stroth U, Zhu YZ (1996). Angiotensin receptor. *J Hypertens* 14: S95-S103.
- Uwabo J, Soma M, Nakayama T, Kanmatsuse K (1998). Association of a variable number of tandem repeats endothelial constitutive nitric oxide synthase gene in essential hypertension in Japanese. *Am J Hypertens* 11: 125-128.
- Valbona C, Pardell H (1993). La hipertensión, enfermedad comunitaria. En Rodicio JL, Romero JC, Ruilope LM, eds. Tratado de Hipertensión. Fundación para el Estudio de las Enfermedades Cardiovasculares, Madrid; pp. 9-18.
- Van Harmelen V, Ariapart P, Hoffsted J, Lundkvist I, Bringman S, Arner P (2000). Increased adipose angiotensinogen gene expression with abdominal fat distribution in obesity. *Obes Res* 8:337-341.
- Villard E, Tiret L, Visvikis S, Rakotovao R, Cambien F, Soubrier F (1996). Identification of new polymorphisms to the angiotensin I-converting enzyme (ACE) and study of their relationship to plasma ACE levels by two-QTL segregation-linkage analysis. *Am J Hum Genet* 58: 1268-1278.
- Walker WG, Whelton, PK, Saito H, Russel RP, Hermann J (1979). Relation between blood pressure and renin, rennin substrate, angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1: 287-291.
- Wang JG, Staessen JA (2000). Genetic polymorphism in the renin- angiotensin system: relevance for susceptibility to cardiovascular disease. *Eur J Pharmacol* 410: 289-302.
- Wang WYS, Zee RY, Morris BJ (1997). Association of angiotensin II Type 1 receptor gene polymorphisms with essential hypertension. *Clin Genet* 51: 31-34.
- Ward R (1995). Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. En: Larrag JH, Brenner BM, eds. Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management. Raven Press, New York; pp. 67-88.
- Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington Pf, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM (1993). A molecular variant of angiotensinogen associated with preclamsia. *Nat Genet* 4: 59-61.
- Wei L, Alhenc-Gelas F, Soubrier F, Hichaud A, Corvol P, Clauser E (1991). Expresión and characterization of recombinant human angiotensin I-converting enzyme. Evidence for a C-terminal transmembrane anchor for a proteolytic processing of the secreted recombinant and plasma enzymes. *J Biol Chem* 266: 5540-5546.
- Weinberger MH (1996). Salt sensitivity: does it play an important role in the pathogenesis and treatment of hypertension?. *Curr Opin Nephrol Hypertens* 5: 205-208.

- Weitz W (1923). Zur aetiologie der genuinen oder vascularem hypertension. *Z Clin Med* 96: 151.
- Wen BS (1996). Genetic Data Analysis II. Sinauer Associates, Sunderland.
- West MJ, Summers KM, Huggard PR (1992). Polymorphism of candidate genes in essential hypertension. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 19: 315-318.
- West MJ, Summers KM, Burstow DJ, Wong KK, Huggard PR (1994). Renin and angiotensin-converting enzyme genotypes in patients with essential hypertension and left ventricular hypertrophy. *Clin Exp Pharmacol Physiol* 21: 207-210.
- WHO (1993). World Heart Organization. *J Hypertens* 11: 905-918.
- Widgren BR, Wikstrand J, Berglund G, Andersson OK (1992). Increased response to physical and mental stress in men with hypertensive parents. *Hypertension* 20: 606-611.
- Williams RR, Hunt SC, Hopkins PN, Stults BM, Wu LL, Hassted SJ (1988). Familial dyslipemic hypertension; evidence from 58 Utah families for a syndrome present in approximately 12% of patients with essential hypertension. *JAMA* 259: 3579-3586.
- Williams RR, Hunt SC, Hassted SJ, Hopkins PM, Wu LL, Berry TD, Stults BM, Barlow GK, Schumacher C, Lifton RP, Lolouel JM (1991). Are the interactions and relations between genetic and environmental factors in predisposing to high blood pressure? *Hypertension* 18: 1.29-1.37.
- Williams AG, Rayson MP, Jubb, World M, Woods, Hayward, Martin J, Humphriest SE, Montgomery HE (2000a). The ACE gene and muscle performance. *Nature* 403: 614.
- Williams SM, Addy JH, Phillips III JA, Dai M, Kpodonu J, Afful J, Jackson H, Joseph K, Eason F, Murray MM, Epperson P, Aduonum A, Wong LJ, Jose PA, Felder RA (2000b). Combinations of variants in multiple genes are associated with hypertension. *Hypertension* 36: 2-6.
- Yanagisawa M, Kurihara H, Kimura S, Goto K, Masaki T (1988). A novel potent vasoconstrictor peptide produced by vascular endothelial cells. *Nature* 322: 411-415.
- Yasujima M, Tsutaya S, Shoji M (1998). Endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism and hypertension in Japanese. *Rinsho Byori* 46: 1199-1204.
- Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T (1997). Functional significance of AC I/D locus for controlling the ACE gene. *J Am Soc Nephrol* 8: 633A.
- Zanchetti A (1986). Essay review of Swales J. D. Platt versus Pickering. *Med History* 30: 94-96.
- Zanchi A, Moczulski DK, Hanna LS, Wantman M, Warram JH, Krolewski AS (2000). Risk of advanced diabetic nephropathy in type 1 diabetes is associated with endothelial nitric oxide synthase gene polymorphism. *Kidney Int* 57: 405-413.
- Zee RYL, Ying LH, Morris BJ, Griffiths LR (1991). Association and linkage analyses of restriction fragment length polymorphisms for the human renin and antithrombin genes in essential hypertension. *J Hypertension* 9: 825-830.
- Zee RYL, Schrader AP, Morris BJ (1996). Effect of angiotensin-converting-enzyme genotype on renin angiotensin components in hypertensives. *Clin Chim Acta* 252: 33-39.
- Zhang X, Erdmann J, Regitz-Zagrosek V, Kurzinger S, Hense HW, Shunker H (2000). Evaluation of three polymorphism in the promoter region of the angiotensin II type 1 receptor gene. *J Hypertens* 18: 267-272.

9. ABREVIATURAS

ACV = Accidente cerebro-vascular.

ADN = Ácido desoxirribonucleico.

AGT = Angiotensinógeno.

AI = Angiotensina I.

AII = Angiotensina II.

AIII = Angiotensina III.

ARN = Ácido ribonucleico.

AT1 = Receptor tipo 1 de la angiotensina II.

AT2 = Receptor tipo 2 de la angiotensina II.

D = Alelo delección.

DE = Desviación estándar.

DO = Densidad óptica.

ECA = Enzima convertidora de la angiotensina I.

FQ = Fibrosis quística.

HDL = Lipoproteínas de alta densidad.

HDLc = Colesterol transportado por las lipoproteínas de alta densidad.

HTA = Hipertensión arterial.

I = Alelo inserción.

IC = Intervalo de confianza.

ICC = Índice cintura/cadera.

IMC = Índice de masa corporal.

JNC = *Joint National Committee*.

K = Potasio.

Kda = Kilodalton.

LDL = Lipoproteínas de baja densidad.

M = Metionina.

Na = Sodio.

Nº = Número de participantes.

Nos = *Nitric oxide synthase*.

NS = No significativo.

OMS = Organización Mundial de la Salud.

ONS = Óxido nítrico sintasa.

PA = Presión arterial.

Paa = Poliacrilamida.

PAD = Presión arterial diastólica.

PAS = Presión arterial sistólica.

Pb = Pares de bases nucleotídicas.

PCR = *Polymerase Chain Reaction*.

PHA-1 = Pseudohipoaldosteronismo tipo 1.

Ren = Renina.

RFLPs = *Restriction Fragment Length Polymorphisms*.

SAM = Simpático adrenal-medular.

SRA = Sistema renina angiotensina.

T = Treonina.

VNTR = *Variable Number of Tandem Repeats*.

WHO = *World Heart Organisation*.

10. ANEXOS

10.1. ANEXO 1: Primera carta de citación a los participantes

Estimado Sr. / Sra.:

Nos ponemos en contacto con Usted para solicitar de nuevo su participación en un estudio que estamos realizando, a través del cual pretendemos conocer si una enfermedad tan frecuente en nuestra sociedad como es la Enfermedad Cardiovascular aparece más en unas familias que en otras, es decir si en su origen hay un componente hereditario o no.

Este estudio lo estamos realizando en la provincia de Albacete y los participantes han sido seleccionados entre las personas que como usted participó tan amablemente en el estudio GEVA, del cual en su día le remitimos los resultados.

La participación en este estudio, por supuesto es totalmente voluntaria, sólo le supondrá la realización de una serie de preguntas breves sobre su historial médico, complementarias a las que se realizaron en su día, y un chequeo en el que mediremos entre otras cosas su Tensión Arterial.

También le extraeremos una muestra de sangre y orina que se utilizarán para medir los niveles de colesterol y glucosa, y estudiar a través de modernas técnicas diagnósticas de laboratorio los marcadores hereditarios de la Tensión Arterial.

El estudio para usted será totalmente gratuito. Si como la anterior vez que se lo solicitamos, es tan amable de prestarnos su colaboración, rogamos que acuda a la siguiente cita:

El éxito de este estudio depende fundamentalmente de su colaboración. Todos los resultados del chequeo que se le practique le serán comunicados para que junto a su familia pueda beneficiarse de ello, y al mismo tiempo contribuir a la lucha contra las Enfermedades Cardiovasculares.

Agradeciéndole su colaboración, le saludan atentamente.

Director del GEVA.

Jefe de Servicio de
Medicina Interna

Vº Bº Director Médico
Hospital General AB.

10.2. ANEXO 2: Segunda carta de citación a los participantes

Estimado Sr/Sra:

Nos permitimos volver a ponernos en contacto con usted, para recordarle que tiene una cita con nosotros el día:

Le recordamos que en esta cita le realizaremos unas breves preguntas sobre el historial médico, un chequeo y le diremos la fecha para la realización del análisis de sangre y orina.

Es importante que acuda a la cita con todos los medicamentos que está usted tomando en el momento actual.

Todos los datos que recogeremos están sometidos al secreto médico y solamente usted tendrá conocimiento de ellos.

Si tiene alguna dificultad para acudir a la cita que le hemos propuesto no dude en ponerse en contacto con nosotros a través del teléfono: 59-72-06, ya que tenemos entera facilidad para modificar según sus necesidades, el día y la hora de su cita.

Le recordamos la importancia de su colaboración para el éxito del estudio que estamos realizando, el cual puede aportar una importante información sobre el conocimiento de las enfermedades cardiovasculares en la provincia de Albacete. Así mismo recuerde que su salud se beneficiará del chequeo y analítica que le practicaremos.

Agradeciéndole de antemano su colaboración, le saludan atentamente.

Director del GEVA

Jefe del Servicio de
Medicina Interna

Vº Bº Director Médico
Hospital General AB.

10.3. ANEXO 3: Cuestionario

MARCADORES GENÉTICOS DE HIPERTENSIÓN ARTERIAL EN POBLACIÓN HISPANA.

Fecha: ____/____/____

Hora: ____:____ am
pm

ID PARTICIPANTE [][][][][][][][][]

Nombre: _____

Teléfono : _____

Hora de inicio : ____:____ Hora de finalización : ____:____

FORMULARIOS A REALIZAR	IDENTIFICACION DEL STAFF
1. Consentimiento	
2. Datos Generales	
3. Presión Arterial	
4. Medidas corporales	
5. Muestra de sangre	

CONSENTIMIENTO INFORMADO

NOMBRE DEL PARTICIPANTE _____

IDENTIFICACION DEL PARTICIPANTE: ☐☐☐☐☐☐

TITULO DEL PROYECTO: Marcadores genéticos de Hipertensión Arterial en población hispana.

Información para los participantes

Información referente al estudio:

Queremos solicitarle su participación en este estudio. Es importante que usted lea y entienda los principios que se van a aplicar a todas las personas que estén de acuerdo en participar en él.

1. Tomar parte en el presente estudio es totalmente voluntario.
2. Usted puede no beneficiarse directamente al tomar parte en el estudio, pero los conocimientos que se obtengan de él pueden ayudar a los profesionales de la salud a conocer mejor el papel que la genética juega en la aparición de la Hipertensión arterial en nuestra población.
3. Usted podrá abandonar el estudio en cualquier momento que lo desee sin ningún tipo de problema y sin perder ningún beneficio a los que usted tenga derecho.
4. Si alguna nueva información llega a obtenerse y que sea importante para usted, será informado de dichos datos.

El propósito del estudio y como va a ser realizado así como cual va a ser su participación en él será descrito en las próximas líneas. También se le explicarán los riesgos, inconvenientes o incomodidades y toda la información que usted necesite para tomar una decisión sobre si desea o no participar. Usted puede discutir y realizar todas las preguntas que desee sobre este estudio con los miembros del equipo

Objetivos del estudio - Poco se conoce en la actualidad acerca de la importancia que la genética, es decir los rasgos hereditarios, tiene en la aparición de enfermedades tan frecuentes como es la Hipertensión Arterial. En los últimos años se ha llegado a saber que su influencia puede ser importante, y que su conocimiento podría ayudar a establecer pautas de prevención sobre aquellas personas con más tendencia a presentar Hipertensión Arterial por mecanismos genéticos o hereditarios.

Los estudios que han llegado a estas conclusiones han sido realizados en diferentes países de Europa, y en Japón y Estados Unidos fundamentalmente.

El _____ está estudiando los marcadores genéticos que la población hispana tiene en relación con la aparición de la Hipertensión

Arterial, comparándola con los descritos en otras poblaciones y analizando su relación familiar. Usted y su familia son invitados a tomar parte en este estudio.

Procedimiento:

Un número de personas y en algunos casos, de familias de _____ capital y de sus pueblos serán invitadas a participar en el estudio. El estudio consistirá en una visita a nuestra consulta, la cual durará aproximadamente 1 1/2 horas.

Visita clínica:

Se le realizarán diferentes preguntas en la visita clínica. Todas las respuestas a las preguntas serán confidenciales.

La entrevista durará 1 1/2 horas. Se le realizarán preguntas sobre su historia médica, sus antecedentes médicos familiares, y sus hábitos de ingesta de alcohol y tabaco. Su altura, peso y presión arterial serán medidas, así como también una muestra de sangre y orina serán tomadas para medir sus cifras de colesterol, otras determinaciones analíticas y sus marcadores genéticos. El DNA es la información genética que pasa de una generación a otra.

Riesgos y molestias: Puede existir una mínima molestia o un pequeño cardenal al realizar la extracción de sangre del brazo.

Beneficios: Existen una serie de posibles beneficios para usted y para su familia. Primero, usted recibirá un chequeo sobre su salud que le informará sobre su peso, altura, colesterol en sangre y presión arterial, y se le ayudará a aprender que pasos debe seguir para alcanzar un mejor estado de salud.

Alternativas: Tomar parte en este estudio es totalmente voluntario. Su decisión sobre si participa o no, no afectará en nada al cuidado que usted recibe. Usted puede retirarse del estudio en cualquier momento sin ningún problema.

CONSENTIMIENTO

Yo he explicado en su totalidad a : _____

de la naturaleza, propósitos y de los procedimientos arriba descritos y de los posibles riesgos que atañen al estudio. Yo he contestado y contestaré a todas las preguntas todo lo mejor que pueda.

(Firma: Investigador principal)

Yo he sido informado de los procedimientos arriba descritos así como de los posibles beneficios y riesgos del estudio. Yo acepto participar en este estudio.

Yo sé que el Dr. _____ o sus colaboradores estarán localizados en el _____ para contestar cualquier pregunta que yo tenga. Yo puedo también solicitar hablar con un miembro del Comité de Investigación del Hospital. Entiendo que soy libre de suspender este consentimiento y dejar de participar en este estudio en cualquier momento sin perjuicio alguno sobre mi asistencia médica. He recibido una copia de este documento sobre consentimiento informado.

En caso de que piense que he sufrido algún daño físico como resultado de mi participación en este estudio o si yo tengo alguna pregunta con relación a mis derechos como participante en este proyecto, puedo contactar con el Comité de Investigación del Hospital.

Yo estoy de acuerdo en permitir que mi nombre y mis datos médicos sean accesibles a médicos e investigadores autorizados, con el propósito de evaluar los resultados de este estudio. Yo permito la publicación de cualquier dato que pueda obtenerse de él con el propósito de avanzar en el conocimiento médico, a condición de que mi nombre y cualquier otra información identificativa no se use junto a esa publicación. Todas las precauciones para mantener la confidencialidad de los datos médicos deberán ser tomadas.

(Firma del participante) Fecha: _____

Fecha: _____

(Testigo de la firma)

A. HISTORIA MÉDICA

A1. Le ha dicho su doctor o algún otro profesional de la salud que usted tuvo...

A2. Que edad tenía cuando le dijeron la primera vez que tuvo..

SI LA RESPUESTA ES "SI" CONTESTE
A2 ANTES DE PASAR A LA SIGUIENTE

- | | | |
|----------------------------|-----------|------------|
| a. Insuficiencia cardiaca? | 0 No 1 Si | años |
| b. Trombosis cerebral? | 0 No 1 Si | años |
| c. Un ataque cardiaco? | 0 No 1 Si | años |
| d. Insuficiencia renal? | 0 No 1 Si | años |
| e. Algún tipo de cáncer? | 0 No 1 Si | años |

- Especificar: _____

B. HISTORIA FAMILIAR

Ahora nos gustaría realizarle algunas preguntas sobre la salud de su familia.

B. Incluyendo los que viven y los que ya han fallecido, a alguno de sus familiares (abuelos, padre, hermanos y hermanas) alguna vez le dijo un médico u otro profesional de la salud que ellos habían tenido...

a. Un ataque al corazón antes de los 50 años?

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 1. Abuela 0 No 1 Si 2 NS | 4. Padre 0 No 1 Si 2 NS |
| 2. Abuelo 0 No 1 Si 2 NS | 5. Hermana 0 No 1 Si 2 NS |
| 3. Madre 0 No 1 Si 2 NS | 6. Hermano 0 No 1 Si 2 NS |
| 7. Otros: especificar: _____ | |

b. Hipertensión antes de los 50 años?

- | | |
|------------------------------|---------------------------|
| 1. Abuela 0 No 1 Si 2 NS | 4. Padre 0 No 1 Si 2 NS |
| 2. Abuelo 0 No 1 Si 2 NS | 5. Hermana 0 No 1 Si 2 NS |
| 3. Madre 0 No 1 Si 2 NS | 6. Hermano 0 No 1 Si 2 NS |
| 7. otros: especificar: _____ | |

c. Una trombosis cerebral antes de los 50 años?

1. Abuela 0 N 1 Si 2 NS | 4. Padre 0 No 1 Si 2 NS
 2. Abuelo 0 No 1 Si 2 NS | 5. Hermana 0 No 1 Si 2 NS
 3. Madre 0 No 1 Si 2 NS | 6. Hermano 0 No 1 Si 2 NS
 7. Otros: especificar: _____
-

d. Diabetes antes de los 50 años?

1. Abuela 0 No 1 Si 2 NS | 4. Padre 0 No 1 Si 2 NS
 2. Abuelo 0 No 1 Si 2 NS | 5. Hermana 0 No 1 Si 2 NS
 3. Madre 0 No 1 Si 2 NS | 6. Hermano 0 No 1 Si 2 NS
 7. Otros: especificar: _____
-

e. Un cáncer antes de los 50 años?

- | | |
|---|--|
| 1. Abuela 0 No 1 Si 2 NS
tipo: _____ | 4. Padre 0 No 1 Si 2 NS
tipo: _____ |
| 2. Abuelo 0 No 1 Si 2 NS
tipo: _____ | 5. Hermana 0 No 1 Si 2 NS
tipo: _____ |
| 3. Madre 0 N 1 S 2 NS
tipo: _____ | 6. Hermano 0 No 1 Si 2 NS
tipo: _____ |
7. Otros: especificar: _____ Tipo: _____
-

C. HIPERTENSION ARTERIAL

C1. Cuando ha sido la última vez que le han tomado la Presión Arterial un médico u otro profesional de la salud.

- | | |
|---|--------------------|
| 0 | nunca |
| 1 | NS |
| 2 | menos de 6 meses |
| 3 | entre 6 m. y 1 año |
| 4 | entre 1 y 5 años |
-

C2. Le ha dicho alguna vez un médico u otro profesional de la salud que usted tenía la presión arterial alta?

0 No 1 Si 2 NS

SI LA RESPUESTA ES "NO" O "NS" PASAR A LA PREGUNTA D1.

PREGUNTA SOBRE TRATAMIENTO EN C3; SI LA RESPUESTA EN "SI" REALIZAR PREGUNTA C4

C3. A causa de tener la presión arterial alta, alguna vez un médico u otro profesional de la salud le ha dicho que

a. Tome tratamiento médico?

0 No 1 Si

b. Controle su peso o que pierda peso?

0 No 1 Si

c. Disminuya la sal en su dieta?

0 No 1 Si

d. Haga más ejercicio?

0 No 1 Si

e. ¿Reduzca la ingesta de alcohol?

0 No 1 Si

C4. Está usted ahora...

a. Tomando tratamiento médico?

0 No 1 Si

b. Controlando/perdiendo peso?

0 No 1 Si

c. Tomando menos sal?

0 No 1 Si

d. Haciendo menos ejercicio?

0 No 1 Si

e. ¿Reduciendo la ingesta de alcohol?

0 No 1 Si

C5. EFICACIA DEL SISTEMA EN EL DIAGNÓSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA HIPERTENSION ARTERIAL (ESTUDIO GEVA).

a. ¿En el estudio GEVA se le informo que tenía la PA alta?

0 No 1 Si 2 NS

SI LA RESPUESTA ES "NO" PASAR A D1

b. ¿Informo usted a su médico que tenía la PA alta?

0 No 1 Si 2 NS

c. ¿Confirmo su médico este diagnóstico?

0 No 1 Si 2 NS

d. ¿ Le puso su médico tratamiento médico por tener la PA alta?

0 No 1 Si 2 NS

e. ¿ Sigue usted correctamente este tratamiento?

0 No 1 Si 2 NS

D. DIABETES

D1. Le ha dicho alguna vez un médico u otro profesional de la salud que usted ha tenido Diabetes?

0 No 1 Si 2 NS

SI LA RESPUESTA ES 'NO' O 'NS' PASAR A LA PREGUNTA E1.

D2. A que edad le dijeron que tenía usted Diabetes? años

D3. A causa de su Diabetes, su médico u otro profesional de la salud le ha dicho que tome tratamiento médico?

0 No 1 Si

D4. Está usted ahora tomando tratamiento médico?

0 No 1 Si

E. DISLIPEMIAS

E1. ¿Le ha dicho alguna vez su médico u otro profesional de la salud que tenía el colesterol elevado?

0 No 1 Si 2 NS

E2. A causa de su colesterol elevado, su médico u otro profesional de la salud ¿ le han dicho tome tratamiento médico?

0 No 1 Si 2 NS

E3. ¿Está tomando tratamiento médico?

0 No 1 Si 2 NS

E4. EFICACIA DEL SISTEMA DE DIAGNOSTICO, TRATAMIENTO Y CONTROL DE LA DISLIPEMIA (ESTUDIO GEVA)

a. En el estudio GEVA ¿se le informo si tenía el colesterol alto?

0 No 1 Si 2 NS

SI LA RESPUESTA ES "NO" PASAR A F1

b. ¿Informe usted a su médico que tenía el colesterol alto?

0 No 1 Si 2 NS

c. ¿Confirmando su médico el diagnóstico?

0 No 1 Si 2 NS

d. ¿Le puso su médico tratamiento, por tener alto el colesterol?

0 No 1 Si 2 NS

e. ¿Sigue usted correctamente el tratamiento?

0 No 1 Si 2 NS

F1. Por favor, diga todos los tratamientos médicos que toma habitualmente.

¿ Desde cuándo los toma?

0 días

a. _____ □□

1 meses

2 años

0 días

b. _____ □□

1 meses

2 años

0 días

c. _____ □□

1 meses

2 años

0 días

d. _____ □□

1 meses

2 años

F2. PARA MUJERES SOLAMENTE:

¿Toma habitualmente píldoras anticonceptivas?

0 No 1 Si 2 NS

F3 ¿Tiene usted la menopausia?

0 No 1 Si 2 NS

F4 ¿A qué edad tuvo usted la menopausia?

□□

G. HÁBITO DE FUMAR

Ahora me gustaría preguntarle acerca de su hábito de fumar.

G1. Ha fumado por lo menos 100 cigarrillos durante toda su vida?

0 No 1 Si

SI LA RESPUESTA ES NO, PASAR A LA H1

G2. Que edad tenía cuando comenzó a fumar de forma regular?

.....años

G3. Fuma en la actualidad?

0 No 1 Si

SI LA RESPUESTA ES 'NO' PASAR A G7

G4. ¿Durante cuántos años fumo usted?

..... años

G5. En la época que fumaba ¿cuántos cigarrillos fumaba?

..... cig. 0 día
1 semana

G6. ¿Cuántos años lleva sin fumar?

.....años

G7. Cuantos cigarrillos fuma habitualmente cada día?

..... cigarrillos / día

G8. Durante cuantos años ha estado fumando esta cantidad?

.....años

H. HÁBITO DE BEBER ALCOHOL

Las siguientes preguntas son acerca de la toma de bebidas alcohólicas. Entre estas se incluyen la cerveza, vino, licores, cócteles y mezclas de bebidas que contengan alcohol

H1. En los pasados 12 meses, ha tomado por lo menos 12 bebidas de cualquier tipo de alcohol?

0 No 1 Si

SI LA RESPUESTA ES 'NO' PASAR A H4

H2. En los pasados 12 meses, ¿cuantos días a la semana, al mes o al año ha tomado cualquier tipo de bebida alcohólica?

0 semana
☐ 1 mes
 2 año
 3 NS

H3. De promedio, en los días que usted bebió alcohol, ¿que número de bebidas hizo al día?

.....bebidas al día

(Por bebida se entiende un bote o botella de cerveza, un vaso de vino o una copa de licor)

H4. ¿Ha bebido anteriormente?

0 No 1 Si

SI LA RESPUESTA ES 'NO', PASAR A I1

H5. ¿Cuantos años hace que dejó de beber?

..... años

H6. ¿Cual era el número habitual de bebidas que usted consumía de promedio por día, semana, mes o año, antes de que dejara de beber bebidas alcohólicas?

0 día
☐ 1 semana
 2 mes
 3 año
 4 NS

H7. ¿Cuántas copas ha bebido la última semana?

☐

ESTADO CONYUGAL

11. ¿Está usted casado en la actualidad, vi-
viendo con alguien como pareja, viudo,
divorciado, separado o nunca ha estado casado?

- 0 casado
- 1 viviendo en pareja
- 2 viudo
- 3 divorciado
- 4 separado
- 5 nunca casado

12. ¿Cuántos hijos tiene usted?:

□□

13. Edades de sus hijos:

_____	_____	_____
_____	_____	_____
_____	_____	_____

14. ¿Cuántos hermanos tiene usted?

□□

J. EDUCACION

J1. ¿Cual es el grado más alto que llegó a
terminar en la escuela?

00 nunca acudió

Preescolar

- 01 primer curso
- 02 segundo curso

EGB

- 03 primer curso
- 04 segundo
- 05 tercero
- 06 cuarto
- 07 quinto
- 08 sexto
- 09 séptimo
- 10 octavo

E. Secundaria

- 11 primero (BUP...)
- 12 segundo
- 13 tercero
- 14 COU

Universidad

- 15 un año
- 16 dos años
- 17 tres años
- 18 cuatro años
- 19 cinco años
- 20 seis años

Graduado Profesional

- 21 1 o más
22 alguna escuela
técnico-comercial

J2. Cual es el grado más alto que llegó a
terminar en la escuela
su cónyuge?

Preescolar

00 nunca acudió

- 01 primer curso
02 segundo curso

EGB

- 03 primer curso
04 segundo
05 tercero
06 cuarto
07 quinto
08 sexto
09 séptimo
10 octavo

E. Secundaria

- 11 primero (BUP...)
12 segundo
13 tercero
14 COU

Universidad

- 15 un año
16 dos años
17 tres años
18 cuatro años
19 cinco años
20 seis años

Graduado Profesional

- 21 1 o más
22 alguna escuela
técnico-comercial

K. OCUPACIÓN

K1. ¿Cual es su ocupación o trabajo habitual?

K2. ¿Está habitualmente empleado?

0 No 1 Si

SI LA RESPUESTA ES 'NO' PREGUNTAR K3

K3. ¿Cuando fue la última vez que trabajó de
forma regular?

____ / ____
mes año

nunca trabajó de forma regular.

K4. ¿Cuál es la ocupación o trabajo habitual de su cónyuge?

PARA USO OFICIAL SOLAMENTE

- | | | |
|---|--------------------------|-----------------------------|
| A | 0 No ocupación | 5 Profesional bajo |
| | 1 No cualificado | 6 Profesional alto |
| | 2 Semicualificado | 7 Ama de casa |
| | 3 Técnico | 8 Jubilado |
| | 4 Trabajo de oficina | 9 Estudiante |
| B | 10 Empleado | 12 Generalmente desempleado |
| | 11 Generalmente empleado | 13 Desempleado |

L. INGRESOS

NS / NC

L1. ¿Cuales son los ingresos totales de su familia antes de pagar impuestos? (sueldo bruto)

□□.□□□.□□□

- 0 individual
1 familiar

M. ESTILO DE VIDA

Responda por favor si o no a las siguientes preguntas:

- | | | | |
|--|------|------|------|
| M1. ¿Tiene usted casa propia? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M2. ¿Tiene usted casa propia con menos de 20 años de antigüedad? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M3. ¿Tiene usted segunda vivienda? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M4. ¿Tiene usted calefacción central? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M5. ¿Tiene usted lavadora en casa? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M6. ¿Tiene usted lavavajillas en casa? | 0 No | 1 Si | 2 NS |
| M7. ¿Tiene usted teléfono en casa? | 0 No | 1 Si | 2 NS |

- ¿ cuántos teléfonos tiene?

□□

- M8. ¿Tiene usted televisión en casa? 0 No 1 Si 2 NS
 - ¿Cuántos TV tienen en casa? □□
- M9. ¿Tiene usted video en casa? 0 No 1 Si 2 NS
 - ¿cuántos vídeos tienen en casa? □□
- M10. ¿Tiene usted cadena musical en casa? 0 No 1 Si 2 NS
- M11. ¿Es usted propietario de tierras? 0 No 1 Si 2 NS
 - tamaño de sus tierras □□□□□
- M12. ¿Es usted propietario de coche? 0 No 1 Si 2 NS
 - año de fabricación del coche □□□□
- M13. ¿Existe un segundo coche en su Casa? 0 No 1 Si 2 NS
- M14. ¿Lee habitualmente los periódicos? 0 Nunca
 1 cada día
 2 cada semana
 3 cada mes
 4 cada año
- M15. ¿Lee habitualmente revistas? 0 Nunca
 1 cada día
 2 cada semana
 3 cada mes
 4 cada año
- M16. ¿Va usted al cine? 0 No 1 Si 2 NS
 - nº de veces al mes □□
-
- M17. ¿Escucha la noticias de la radio? 0 Nunca
 1 cada día
 2 cada semana
 3 cada mes
 4 cada año
-
- M18. ¿Escucha las noticias de la TV? 0 Nunca
 1 cada día
 2 cada semana
 3 cada mes
 4 cada año
-
- M19. ¿Viaja fuera de la ciudad de vacaciones? 0 No 1 Si 2 NS

- ¿cuántas veces al año?

☐☐

M20. ¿Viaja fuera del país de vacaciones?
- ¿cuántas veces al año?

0 No 1 Si 2 NS

☐☐

M21. ¿Come o cena fuera de su casa
Habitualmente?

0 Nunca
1 cada día
2 cada semana
3 cada mes
4 cada año

M22. ¿Habla otro idioma?

0 NO 1 Si 2 NS

M23. ¿Lee libros habitualmente?
- ¿cuántos al año?

0 No 1 Si 2 NS

☐☐

M24. ¿Practica algún deporte habitualmente?

0 Nunca
1 cada día
2 cada semana
3 cada mes
4 cada año

M25. ¿Tiene usted ordenador en casa?

0 No 1 Si 2 NS

M26. ¿Qué porcentaje de su sueldo dedica
A comprar ropa?

☐☐ %

M27. ¿Cuántas veces comen en casa?:

- carne

☐☐

- pescado

☐☐

- fruta

☐☐

- vegetales

☐☐

N. APOYO SOCIAL

Señale con quién suele usted compartir los siguientes teóricos problemas:

	Familia*	Amigo	Vecino	Otro**
N1. Pedir un préstamo				
N2. Tener deudas				
N3. Sentirse enfadado o deprimido				
N4. Estar enfermo				

N5. Necesitar un consejo

N6. Tener problemas en el trabajo

* (1) miembro de su familia nuclear
(2) otro tipo de relación familiar

** (1) compañero de trabajo
(2) miembro de la Iglesia
(3) profesional de la salud
(4) otros

O. ESTRÉS

FACTORES DE ESTRÉS PERCIBIDOS

Puntúe de 1 (menos) a 5 (más) los siguientes problemas en relación con el estrés que cree usted que le producen cada uno de ellos.

1 2 3 4 5

O1. Matrimonio

O2. Divorcio

O3. Muerte de un familiar

O4. Enfermedad suya o de un familiar

O5. Conseguir un trabajo

O6. Perder el empleo

O7. No poder con sus obligaciones económicas

O8. Problemas de relación laboral

O9. Problemas de relación familiar

FACTORES DE ESTRÉS CRÓNICO

O10. ¿Siente que su cónyuge es cariñoso?	0 No	1 Si	2 NS
O11. ¿Tiene dinero para acabar el mes?	0 No	1 Si	2 NS
O12. ¿Le gusta ir a su trabajo?	0 No	1 Si	2 NS
O13. ¿Suele tener dinero para pagar sus deudas?	0 No	1 Si	2 NS
O14. ¿Se apoya en su cónyuge para solucionar sus Problemas?	0 No	1 Si	2 NS
O15. ¿Encuentra su trabajo estimulante?	0 No	1 Si	2 NS

- O16. ¿Le preocupa tener suficiente dinero cuando se jubile? 0 No 1 Si 2 NS
- O17. ¿Cree que tiene suficiente dinero para vivir? 0 No 1 Si 2 NS
- O18. ¿Cree que puede hablar con su cónyuge sobre Temas importantes? 0 No 1 Si 2 NS
- O19. ¿Cree que su cónyuge espera más de lo que le da? 0 No 1 Si 2 NS
- O20. ¿Cree que cobra poco en su trabajo? 0 No 1 Si 2 NS

P. ACTIVIDAD FÍSICA

P1. Durante los pasados 7 días, ¿cuántas veces ha paseado usted por alguna razón?, por ejemplo, por hacer ejercicio, ir al trabajo, sacar a pasear al perro, ir andando hasta el autobús etc.....

0 nunca	1 pocas veces (1-2 días)	2 algunas veces (2-3 días)	3 a menudo (5-7 días)
---------	-----------------------------	-------------------------------	--------------------------

P2. Durante los pasados 7 días ¿cuántas veces ha hecho deporte u otras actividades similares?.

0 nunca	1 pocas veces (1-2 días)	2 algunas veces (2-3 días)	3 a menudo (5-7 días)
---------	-----------------------------	-------------------------------	--------------------------

P3. Durante los últimos 7 días ¿cuántas horas ha pasado realizando trabajos ligeros, como ordenar, limpiar el polvo, planchar, lavar etc?

□□

P4. Durante los últimos 7 días ¿cuántas horas ha pasado realizando trabajos pesados tales como fregar el suelo, limpiar las ventanas, lavar ropa pesada u otros? □□

P5. Durante los pasados 7 días ¿ha realizado alguna de las siguientes actividades?

- | | |
|--|-----------|
| a. Ir de compras | 0 No 1 Si |
| b. Realizar reparaciones en casa (pintar, empapelar..) | 0 No 1 Si |
| c. Trabajar en el jardín | 0 No 1 Si |
| d. Cuidar otra persona | 0 No 1 Si |

P6. Durante los últimos 7 días ¿ha realizado algún trabajo pagado y/o como voluntario?

0 No 1 Si

P7. De promedio, ¿cuántas horas a la semana realizó un trabajo y/o como voluntario?

□□

Si el participante respondió "sí" a tener un trabajo, realizar las siguientes preguntas:

P8. ¿Cuál de las siguientes categorías describe mejor la cantidad de actividad física requerida en su trabajo?

- 1) Principalmente trabajo sentado con movimiento de brazos (oficina, trabajador de una línea de montaje sentado...)
- 2) Sentado o de pie, andando algunas veces (cajero, trabajador general de una oficina, trabajador de una maquinaria ligera...)
- 3) Andar llevando generalmente material con pesos inferiores a 23 Kg. (carteros, camarero, trabajador de la construcción, trabajador de maquinaria pesada.....)
- 4) Andar y trabajar con material pesado, a menudo requiriendo llevar materiales superiores a 23 kg. (albañil, jornalero, peón...)

Ahora le explicaremos el procedimiento para realizar las mediciones del pulso y de la presión arterial. Es importante que usted permanezca relajado y sentado durante las mediciones, las cuales llevarán aproximadamente 15 minutos. Yo colocaré el manguito de la presión arterial alrededor de su brazo, tomando su pulso y posteriormente inflando el manguito. Usted sentirá una sensación de presión sobre su brazo cuando el manguito esté inflado. Yo inflaré éste un máximo de cinco veces. Mientras yo le tome la presión arterial es mejor que no hablemos. Si usted quiere realizar cualquier pregunta yo le contestaré a todas ellas antes o después de realizar las mediciones. Yo le informaré de los resultados de las mediciones al final.

1. Ha tomado cualquier alimento, alcohol, café o fumado en los últimos 30 minutos?

(Si la respuesta es 'Si' realizar primero las mediciones antropométricas)

Alimentos:	0	No	1	Si
Alcohol:	0	No	1	Si
Café:	0	No	1	Si
Cigarrillos:	0	No	1	Si

2. Circunferencia del brazo □□□.□ cm

3. Manguito de presión seleccionado:	0 adulto pequeño (17-25cm) 1 adulto (25-35cm) 2 grande (31-40cm) 3 muslo (38-50cm)
--------------------------------------	---

4. Brazo seleccionado:	0 derecho 1 izquierdo razón _____
------------------------	---

5. Frecuencia cardiaca durante 30 segundos □□□

6. El pulso ¿es regular?	1 Sí 0 No
--------------------------	--------------

7. Presión de obliteración del pulso (POP) : □□□

8. Nivel máximo de hinchado: POP + 30 mmHg: □□□

9. Primera medición de la presión arterial, brazo izquierdo □□□ / □□□
PAS PAD

- 0 Negativa a tomarse PA
 Razón: _____
- 1 PA no tomada
 Razón: _____

10. Primera medición de la presión arterial en brazo derecho □□□ / □□□
PAS PAD

11. Frecuencia cardiaca durante 30 segundos: □□□

12. Segunda medición de la presión arterial en el brazo derecho □□□/□□□
PAS_PAD

13. Frecuencia cardiaca durante 30 segundos: □□□

14. Tercera medición de la presión arterial:
en el brazo derecho

□□□ / □□□
PAS PAD

15. APUNTAR EL NUMERO DE IDENTIFICACIÓN DEL
ESFIGNOMANOMETRO

□□

16. APUNTAR EL MOMENTO DEL DÍA EN QUE LA
PRESIÓN ARTERIAL FUE TOMADA:

□□ : □□ 0 am
1 pm

Ahora le voy a medir su peso, altura, y las mediciones de su cintura y cadera.
Yo le explicaré como hacemos cada una de ellas.

PESO

□□□.□□ kg.

NUMERO DE ESCALA

□□

ALTURA

□□□.□□ cm

CIRCUNFERENCIA DE CINTURA:

1 □□□.□□ cm
2 □□□.□□ cm
3 □□□.□□ cm

¿Que ropa tiene puesta cuando la medición
ha sido realizada?

0 No ropa: piel
1 camisa; vestido
2 ropa interior sólo
3 camisa y ropa interior

CIRCUNFERENCIA DE CADERA:

1 □□□.□□ cm
2 □□□.□□ cm
3 □□□.□□ cm

¿ Que ropa tiene puesta cuando la medición
ha sido realizada?

0 No ropa: piel
1 camisa; vestido
2 ropa interior sólo
3 camisa y ropa interior

Grosor de la ropa utilizada de
cintura para arriba:

0 Ninguno
1 Fina
2 Gruesa

Grosor de la ropa utilizada de
Cintura para abajo

0 Ninguno

1 Fina

2 Gruesa

Ahora vamos a extraerle una muestra de sangre. Una parte de la muestra extraída será utilizada para llevar a cabo un estudio que nos ayudará a entender el papel que la herencia puede tener en las enfermedades crónicas como es la Hipertensión Arterial.

¿Cuándo ha sido la última vez que bebió o comió algo?:

Fecha: ____/____/____
 día mes año

Hora : □□:□□

1. Está de acuerdo con realizar la extracción de sangre: 0 No 1 Sí

Si la respuesta es NO, explicar las

razones: _____

Actividades realizadas:

1. Extracción de 1 tubos de 10 ml y 2 de 5 ml

con sangre venosa con tubos con EDTA (plasma): 0 No 1 Sí

2. Extracción de 1 tubo de 5 ml con sangre venosa

con tubo sin EDTA (suero): 0 No 1 Sí

Comentarios: _____

9.4. ANEXO 4: Informe de resultados

Nombre: _____

Fecha: _____

A continuación le informamos de los resultados del chequeo realizado durante su participación en el estudio. Si tiene alguna pregunta acerca de estos resultados, póngase en contacto con nosotros en el teléfono: 59-72-06.

Tensión arterial: _____ / _____ Normal: 140/90 mm Hg

Colesterol total: _____ mg/dl Normal: hasta 220 mg/dl

Colesterol HDL: _____ mg/dl Normal : > 35mg/dl

Triglicéridos: _____ mg/dl Normal: hasta 200 mg/dl

Glucosa: _____ mg/dl Normal: hasta 110 mg/dl

Si estos resultados son más elevados que los valores normales, le recomendamos se los muestre a su médico, quién le aconsejará sobre las medidas a tomar.

Gracias por su participación en el estudio, y esperamos poder servirle en el futuro.

Firma: _____

10.5. ANEXO 5: Publicaciones

- Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, JA Divisson, Vidal A, Fernández JA (2000). Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 14: 131-135.
- Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrion L, Artigao M, JA Divison, Fernández JA (2002). Threonines at position 174 and 235 of the angiotensinogen polypeptide chain are related to familial history of hypertension in a Spanish-Mediterranean population. *Br J Biomed Sci* (en prensa).
- Poch E, de la Sierra A, González-Núñez D, Oriola J, Redón J, Chaves FJ, Marín P, Giner V, Pamies E, Villar J, Ramírez R, Stiefel P, Rodríguez Pérez JC, Rodríguez Esparragón F, Martínez E, Carrión L, Sanchis C, División JA. (2001). Polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina e hipertensión arterial esencial. Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial. *Med Clin (Barc)* (en prensa).

10.2. ASPECTOS CLÍNICOS Y FISIOLÓGICOS

- **Asociación entre el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y la hipertensión arterial.** El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se ha asociado con la hipertensión arterial en algunos estudios, pero no en otros. En un estudio de caso-control, se encontró que los individuos con el genotipo *DD* del ACE tenían un mayor riesgo de hipertensión arterial que los individuos con el genotipo *dd*. Sin embargo, en un estudio de cohortes, no se encontró asociación entre el genotipo del ACE y la hipertensión arterial.
- **Asociación entre el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y la resistencia a la insulina.** El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se ha asociado con la resistencia a la insulina en algunos estudios, pero no en otros. En un estudio de caso-control, se encontró que los individuos con el genotipo *DD* del ACE tenían un mayor riesgo de resistencia a la insulina que los individuos con el genotipo *dd*. Sin embargo, en un estudio de cohortes, no se encontró asociación entre el genotipo del ACE y la resistencia a la insulina.
- **Asociación entre el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y la obesidad.** El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se ha asociado con la obesidad en algunos estudios, pero no en otros. En un estudio de caso-control, se encontró que los individuos con el genotipo *DD* del ACE tenían un mayor riesgo de obesidad que los individuos con el genotipo *dd*. Sin embargo, en un estudio de cohortes, no se encontró asociación entre el genotipo del ACE y la obesidad.
- **Asociación entre el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) y la diabetes mellitus.** El polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se ha asociado con la diabetes mellitus en algunos estudios, pero no en otros. En un estudio de caso-control, se encontró que los individuos con el genotipo *DD* del ACE tenían un mayor riesgo de diabetes mellitus que los individuos con el genotipo *dd*. Sin embargo, en un estudio de cohortes, no se encontró asociación entre el genotipo del ACE y la diabetes mellitus.

En conclusión, el polimorfismo del gen de la enzima convertidora de la angiotensina (ACE) se ha asociado con la hipertensión arterial, la resistencia a la insulina, la obesidad y la diabetes mellitus en algunos estudios, pero no en otros. Se necesitan más estudios para confirmar estos resultados.

ORIGINAL ARTICLE

Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population

E Martínez¹, A Puras², J Escribano³, C Sanchis⁴, L Carrión⁴, M Artigao⁴, JA Divisón⁴, J Massó⁴, A Vidal¹ and JA Fernández³

¹Department of Medicine and the Research Unit, Albacete General Hospital; ²Department of Medicine, Alcorcón Foundation Hospital, Madrid; ⁴Primary Care Centers, Albacete; ³Biotechnology Division, Institute for Regional Development, University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain

Angiotensin-converting enzyme (ACE) levels and ACE gene polymorphisms have been related with hypertension but with contradictory results between populations. We have investigated the association among the allelic distribution of the insertion-deletion (I/D) polymorphism of the ACE gene, identified by polymerase chain reaction (PCR), serum ACE activity determined by spectrophotometry, and the blood pressure (BP), in a Mediterranean population in the southwest of Europe. A total of 1322 randomised individuals were analysed, and a comparative study was conducted analysing 205 indi-

viduals from the group with highest BP (fifth quintyl) and 196 from the group with lowest BP (first quintyl). In addition we have studied the frequencies of alleles in separated groups of women and men. We conclude that in this population there is no association between I/D polymorphism and hypertension. However, we have found a statistically significant association between the presence of the D allele in the genotypes and an elevation of serum ACE activity.

Journal of Human Hypertension (2000) 14, 131-135

Keywords: angiotensin-converting enzyme; I/D polymorphism; Mediterranean population; serum ACE activity

Introduction

The renin-angiotensin system plays a major role in the homeostasis of blood pressure (BP). One of the enzymes of this system is the angiotensin-converting enzyme (ACE) that converts angiotensin I to angiotensin II. ACE is a peptidyl dipeptidase that releases C-terminal dipeptides from substrates. The genetic control of ACE levels has been suggested by identification of an Alu insertion-deletion (I/D) polymorphism of the ACE gene located in intron 16 of this gene (chromosome q 23).¹⁻³ The D allele was reported to be a risk factor for several cardiovascular diseases including myocardial infarction, left ventricular hypertrophy and essential hypertension in some populations under study,⁴⁻⁷ but could not later be proven in others.⁸⁻¹³ To our knowledge there is no evidence of any genetic study of ACE performed in a Mediterranean population.

In the present work we analyse the I/D polymorphism and the serum ACE activity in a Spanish population comprised of 205 individuals with the

highest BP levels (fifth quintyl group), and 196 individuals with the lowest BP levels (first quintyl group).

Materials and methods

Study subjects

A cross-sectional study of the general population of the Province of Albacete, located in the southeast of Spain, with a population of 218 462 inhabitants over 18 years of age according to the 1991 census, and with similar demographic characteristics to the rest of the country was carried out in order to establish the prevalence of different cardiovascular risk factors (CVRF). All persons of more than 18 years of age were included. The sample size was calculated on the basis of a previous survey in which a prevalence of peripheral artery disease of 1.4% was registered. To obtain a confidence interval of 0.9% to 1.9% with respect to the expected prevalence of peripheral artery disease, a total of 2121 participants was required. The final sample included 1322 persons. The random stratified sample was examined in two phases with sample sizes proportional to the sizes of local population, ie, 40% of participants were from the capital (urban area), 23.1% from towns of more than 10 000 inhabitants (small urban areas), and 36.9% from towns and villages of less

Correspondence: Dr Angel Puras, Department of Medicine, Fundación Hospital, Alcorcón: c/Budapest s/n, 28922 Alcorcón, Madrid, Spain

Received 8 September 1999; revised and accepted 20 October 1999

Table 1 Age, sex, systolic blood pressure, diastolic blood pressure and body mass index of the two groups of the study

	Age	Sex (% male)	SBP	DBP	BMI
1st quintyl	50.4	44.7	117.3	72.1	26.3
5th quintyl	51.6	47.9	138*	79.8*	29.1*

* $P < 0.001$ between groups.

SBP, systolic blood pressure; DBP, diastolic blood pressure; BMI, body mass index.

than 10 000 inhabitants (rural areas). During the first phase of the study, participants in each group were selected at random from 22 population zones, whereas in the second phase, participants were selected by systematic random sampling and then contacted.

Baseline information was collected with the use of previously designed questionnaires.¹⁴ This included personal and family history of cardiovascular diseases and risk factors. After completion of the questionnaires, the patient's weight, height and BP were registered. BP was measured following the recommendations of the British Society of Hypertension in the sitting position after 15 min of rest using a conventional mercury sphygmomanometer. The lower of two measurements taken 5 min apart was selected for the study. Systolic and diastolic BP were defined as being the first and fifth Korotkoff sounds, respectively. Seven observers who were previously trained and passed a certification test with a double-headed stethoscope and a video-test conducted the study; this certification was repeated every 3 months.

We selected for this study a subsample from the previously cross-sectional survey, adjusting by age (decades) and sex, of 205 participants with the highest BP values (fifth quintyl group), and compared with 196 participants with the lowest BP levels (first quintyl group). A significant percent of cases had no clinical criteria of hypertension (Table 1).

In these two groups we analysed the I/D variants of the ACE gene by polymerase chain reaction (PCR) and the levels of ACE using a spectrophotometric assay.

Experimental procedures

For genotype analysis, genomic DNA was extracted from 300 μ l of whole peripheral blood using a commercial kit (Mammalian Genomic Kristal Kit of Cambridge Technologies, Cambridge, UK) according to the manufacturer's instructions. Oligonucleotide primers used to amplify the I/D region of the human ACE gene were as described by Lindpainter *et al.*¹⁵ Primers 5' GCCCTGCAGGTGTCTGCAGCATGT-3' (sense primer) and 5' GGATGGCTCTCCCCGCC TTGTCTC-3' (antisense primer) produced 319 and 597-bp amplicons for D and I alleles, respectively. Reactions were carried out in a total volume of 25 μ l containing 0.5 μ M primers, 2.0 mM deoxynucleotide triphosphate, 1.3 μ M Cl_2Mg , 50 mM KCl,

10 mM tris HCl, pH 8.4, 0.1%, Triton X-100, 0.5 units of Taq polymerase and 100 μ g of human genomic DNA. The thermocycling procedure was carried out in a Perkin-Elmer 2400 thermocycler (Foster City, CA, USA) which consisted of 35 cycles of denaturation at 94°C for 30 sec, annealing at 56°C for 45 sec, and extensions at 72°C for 2 min, followed by a final extension at 72°C for 7 min. The amplification products (D and I alleles) were analysed using 2% agarose electrophoresis. Because the D allele in heterozygous samples is preferentially amplified¹⁵, each sample found to have the DD genotype was subjected to a second independent PCR amplification, with a primer pair that recognised an insertion-specific sequence. The primers were 5' TGGGACCACAGCGCCCGCCACTAC-3' (sense primer) and 5'TCGCCAGCCCTCCCATGCCCATAA-3' (antisense primer). Amplification was carried out under identical PCR conditions except for an annealing temperature of 70°C. The reaction yields a 335-bp amplicon only in the presence of an I allele and no product in samples homozygous for DD. This procedure correctly identified the 4 to 5% of samples with the DI genotype that are misclassified as DD with the insertion-spanning primers.

The enzymatic activity of serum ACE was measured with a kit from Sigma Diagnostics (St Louis, MI, USA), according to the manufacturer's instructions and using an automatic analyser Hitachi 704 (Hitachi, Japan).

Statistical analysis

The distribution of all variables was examined. Differences between groups were examined through use of the *t*-test and Chi-square statistic. Statistical significance was noted if a computed two-tailed probability value was less than 5% ($P < 0.05$). The SPSS PC+ computer program was used for statistical analysis.

Results

In order to determine if a relationship exists between the distinct genotypes for the I/D polymorphism of the ACE gene, the serum ACE activity, and the BP levels of persons, we conducted an epidemiological study in a population from the southeast of Spain. A total of 1322 randomised individuals were enrolled in the study. As a first approach a comparative study was carried out with 205 subjects from the highest BP group (fifth quintyl), and 196 from the lowest BP group (first quintyl) (Table 1). Allelic frequencies in this study were in Hardy-Weinberg equilibrium for the ACE I/D polymorphism.

The difference of allele frequencies and genotype distribution between the fifth quintyl group and the first quintyl group was not statistically significant for the entire population ($P = 0.696$) which included men and women (Table 2).

We also studied the I/D polymorphism in men because previous works found a significant linkage of the ACE locus marker with diastolic BP in males.^{16,17} Nevertheless, in our population the difference of genotype frequencies between men with

Table 2 ACE genotypes distribution and allele frequencies of the ACE insertion/deletion polymorphism in the two groups of the study, in individuals under 50 years old and in males

Groups	Genotypes No. (%)			Alleles No. (Freq.)	
	II	ID	DD	I	D
1st quintyl (n = 196)	29 (14.8)	96 (49.0)	71 (36.2)	154 (0.393)	238 (0.607)
5th quintyl (n = 205)	27 (13.2)	109 (53.2)	69 (33.7)	163 (0.398)	247 (0.602)
<i>P</i> = 0.697					
1st quintyl <50 (n = 89)	16 (18.0)	43 (48.3)	30 (33.7)	75 (0.421)	103 (0.579)
5th quintyl <50 (n = 94)	10 (10.6)	51 (53.1)	33 (35.1)	71 (0.377)	117 (0.623)
<i>P</i> = 0.355					
Male 1st quintyl (n = 88)	9 (10.2)	49 (55.7)	30 (34.1)	67 (0.381)	109 (0.619)
Male 5th quintyl (n = 98)	16 (16.3)	52 (53.1)	30 (30.6)	84 (0.429)	112 (0.571)
<i>P</i> = 0.468					

I, Insertion allele; D, Deletion allele; n, number of individuals; Freq, frequency.

Table 3 Serum ACE activity in different genotypes of the entire population (first quintyl group and fifth quintyl group without antihypertensive drug treatment)

Genotypes (n)	ACE (U/L)	Systolic BP	Diastolic BP
II (n = 52)	29.25	124.4	75.0
ID (n = 183)	34.28	125.7	74.9
DD (n = 124)	42.57*	124.4	75.6

P < 0.0001 between genotypes.

n, number of individuals; U/L, units/liter; BP, blood pressure.

highest BP (fifth quintyl) and men with lowest BP (first quintyl) was not significant (*P* = 0.468) (Table 2), in agreement with a previous study.¹⁸

We have not found a relationship between genotypes and family history of hypertension or evident clinical hypertension (data not shown). It has been reported that age could modulate the influence of ACE genetic variation on BP levels. In spite of that, we do not see a significant association between genotypes and BP in persons under 50 years of age (Table 2).

For the ACE activity analysis, subjects who received antihypertensive drug treatment were eliminated. ACE activity was significantly higher in individuals with DD genotype than in individuals with ID genotype and with II genotype, for the fifth quintyl and first quintyl groups together (*P* < 0.0001) (Table 3). There were not any differences in systolic and diastolic BP levels between genotype groups (Table 3).

We could detect a modest linear relationship between ACE activity and systolic BP (*r* = 0.10; *P* < 0.05). A multivariate analysis was carried out to assess the independence between different factors.

Table 4 Multivariate analysis of the relationship between ACE activity and genotype and systolic blood pressure

Dependent variable	Independent variable	Coefficient
Systolic BP	Age	0.5249*
	Gender	-3.322
	BMI	1.3873*
	ACE activity	0.0012
Systolic BP	Age	0.5296*
	Gender	-3.4268
	BMI	1.3612*
	ACE genotype	0.4367

**P* < 0.0001.

BP, blood pressure; BMI, body mass index.

Among untreated participants ACE activity was not significantly related to systolic BP in a model which included BMI, age and gender. In a similar model but including ACE genotype, DD was not related with systolic BP levels (Table 4).

Discussion

The influence of ACE gene polymorphisms on BP is under controversy. Despite evidence that the renin-angiotensin system is an important determinant of blood pressure, and the complementary findings on the benefit of ACE inhibition, a direct relationship between the I/D ACE polymorphism and hypertension has been difficult to demonstrate. Various reports described the D allele as a risk factor for essential hypertension in various populations^{6,7} whereas other studies disagree with that hypothesis.⁸⁻¹³

Our work is, to our knowledge, the first one to be

done in a Mediterranean population, and reveals no association between the I/D polymorphism and BP (Table 2). When we tested the serum activity of ACE in all of the individuals (fifth quintyl and first quintyl groups) it showed significantly higher values in individuals with more D alleles (DD>DI>II). Due to the fact that PCR amplification occurs in an intron, it can be suggested that such non-coding region would be implicated in the regulation of the ACE gene transcription, not excluding alternative explanations proposed by Tiret *et al.*,² who say that two alternative hypotheses might explain how the variant identified here affects serum ACE levels. As a first hypothesis the low level of ACE would be an indirect consequence of a low expression of the ACE gene, a second hypothesis, the plasma level would be separately modified by a mutation that might either alter the proteolytic cleavage of ACE or decrease the expression of the mRNA for the soluble form.

Most reports demonstrate an association between a 287-bp deletion in the 16th intron of the ACE gene and an increment in ACE activity, but only a few of them associate the D allele with essential hypertension. ACE converts angiotensin I to angiotensin II, a potent vasopressor, and inactivates bradykinin, a vasodilator. That effect could explain the role of higher levels of ACE in determining BP. However, many other additional factors are also involved, such as substrate levels, interaction with angiotensin II receptors, presence of other peptidases, etc., all of them with their correspondent genetic determinants. The integration of all of them and the influence of environmental factors would determine the final effect of ACE gene variants on BP. This multifactorial determination could explain the contradictory results obtained in the analysis of I/D polymorphism by different authors.

Some authors have proposed a three-compartment model which seems appropriate to capture relationships between gene, ACE activity and BP levels. At the genetic level, a fixed effect, linked to the I/D polymorphism, determines a portion of the variance in serum ACE. At the level of the physiologic intermediate, ACE expression is further influenced by unmeasured environmental factors, and is correlated with body mass index (BMI) and BP. These two phenotypes are related to each other.¹⁹

Due to this discrepancy the importance of using homologous populations in studies comparing ACE gene variants has been emphasised. Altogether these studies could contribute to create a map of the distribution of ACE allelic frequencies and the plausible influence of genetic and epigenetic factors on BP. For instance, one can speculate if the Mediterranean diet could play a role in disguising the genetic predisposition effect, if it exists, to have high BP.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the 'Fondo de Investigaciones Sanitarias' (F.I.S. 97/2123). EM was recipient of fellowships from the 'Cultural Albacete' Public Consortium and the 'Caja Castilla-La Mancha' Savings Bank.

The authors wish to thank Dr A Mora (Laboratory of Clinical Analysis of the General Hospital of Albacete) for helping in measuring the ACE activity.

References

- 1 Rigat B *et al.* An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; **86**: 1343-1346.
- 2 Tiret L *et al.* Evidence from combined segregation and linkage analysis, that a variant of the angiotensin I-converting enzyme (ACE) gene controls plasma ACE levels. *Am J Human Genet* 1992; **51**: 197-205.
- 3 Lifton RP. Molecular genetics of human blood pressure variation. *Science* 1996; **272**: 676-680.
- 4 Cambien F, Poirier O, Lecerf L. Deletion polymorphism in the gene for angiotensin-converting enzyme is a potent-risk factor for myocardial infarction. *Nature* 1992; **359**: 641-644.
- 5 Schunkert H, Hense H-W, Holmer SR. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin-converting-enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med* 1994; **330**: 1634-1638.
- 6 Higasmori K *et al.* Association analysis of a polymorphism of the ACE gene with essential hypertension in the Japanese population. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **191**: 399-404.
- 7 Duru K *et al.* Frequency of a deletion polymorphism in the gene for angiotensin converting enzyme is increased in African-Americans with hypertension. *Am J Hypertens* 1994; **7**: 759-762.
- 8 Jeunemaitre X *et al.* Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme locus and human essential hypertension. *Nature Genet* 1992; **1**: 72-75.
- 9 Harrap SB *et al.* The angiotensin I converting enzyme gene and predisposition to high blood pressure. *Hypertension* 1993; **21**: 455-460.
- 10 Gu XX *et al.* Lack of association between the I/D polymorphism of the angiotensin-converting enzyme gene and essential hypertension in a Belgian population. *J Hum Hypertens* 1994; **8**: 683-685.
- 11 Kamdar S *et al.* ACE insertion deletion (I/D) polymorphism in Vincentian African Caribbean with essential hypertension. *J Hum Hypertens* 1994; **8**: 611.
- 12 Morise T, Takeuchi Y, Takeda R. Angiotensin-converting enzyme polymorphism and essential hypertension. *Lancet* 1994; **343**: 125.
- 13 Chiang FT *et al.* Lack of association of the angiotensin converting enzyme gene polymorphism with essential hypertension in a Chinese population. *Am J Hypertens* 1997; **10**: 197-201.
- 14 Puras A *et al.* Prevalence, awareness, treatment and control of hypertension in a Spanish population. *Euro J Epidemiol* 1998; **14**: 31-36.
- 15 Lindpainter K *et al.* A prospective evaluation of an angiotensin-converting-enzyme gene polymorphism and the risk of ischemic heart disease. *N Engl J Med* 1995; **332**: 706-711.
- 16 O'Donnell JC *et al.* Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham Heart Study. *Circulation* 1998; **12**: 1766-1772.
- 17 Fornage M *et al.* Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. *Circulation* 1998; **97**: 1773-1779.
- 18 Popov V, Formichea E, Kovalev J, Schwartz E. Absence of association between the angiotensin-converting enzyme gene polymorphism and borderline hyperten-

sion in men of St Petersburg, Russia. *J Hum Hypertens* 1996; 10: 557-559.

19 Forrester T et al. The angiotensin converting enzyme

and blood pressure in Jamaicans. *Am J Hypertens* 1997; 10: 519-524.

1 June 2001

Professor J.A. Fernandez
Bioscience Unit
Caixa de Correio 10
07500
Alcobaca
Spain

Ref 06/01

Dear Prof. Fernandez

Thank you for your letter of 27 April and the enclosed original manuscript entitled 'Thrombin, a putative 12 and 13 kDa angiotensin converting enzyme inhibitor, is found in plasma of hypertensive and in Spanish Mediterranean populations'.

I am very pleased to confirm that it has been accepted for publication and will appear in issue 4, page 417-426. In due course you will receive a proof from the publisher, which I would ask you to check carefully and then return to me. I would like to take this opportunity to thank you for your kindness in having submitted this paper to me, and for your help, support and cooperation.

Yours sincerely,



Brian Nalton
Editor

Editor

BR Nation FIBMS CMLM

Department of Histopathology and Cytology

County Hospital, Hereford, HR1 2ER, UK

Tel: +44 (0)1432 364043, Fax: +44 (0)1432 364136

Email: brian.nation@hh-tr.wmids.nhs.uk

1 June 2001

Professor JA Fernandez
Biotechnologia-IDR
Campus Universitario s/n
02071
Albacete
Spain

Ref: 06/01

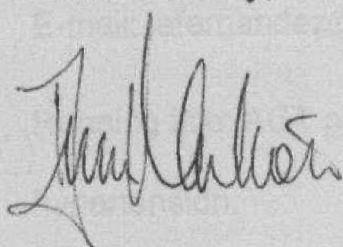
Dear Prof. Fernandez,

Thank you for your letter of 25 April, and the enclosed revised manuscript entitled 'Threonines at position 174 and 235 of the angiotensin polypeptide chain are related to familial history of hypertension in a Spanish-Mediterranean population'.

I am now pleased to confirm that it has been accepted for publication and will appear as soon as space allows. In due course you will receive a proof from the publisher, which I would ask you to check carefully and then return to me.

I would like to take this opportunity to thank you for your kindness in having submitted this paper to me, and for your help, support and cooperation.

Yours sincerely,



Brian Nation
Editor

Threonines at position 174 and 235 of the angiotensinogen polypeptide chain are related to familial history of hypertension in a Spanish-Mediterranean population.

E Martínez¹; A Puras²; J Escribano³; C Sanchis²; L Carrión²;

M Artigao²; J A Divisón²; J Massó² and J A. Fernández³

¹Research Unit, Albacete General Hospital, Albacete, Spain.

²Group of Vascular Diseases of Albacete (GEVA), Albacete, Spain.

³Biotechnology Division, Institute for Regional Development (IDR),
University of Castilla-La Mancha, Albacete, Spain.

Correspondence: Prof. J A Fernández. Biotecnología-IDR, Campus
Universitario s/n, 02071 Albacete, Spain. Phone: +34-967-599309,
Fax: +34-967-599233;

E-mail: jafernandez@idr-ab.uclm.es

Running title: AGT polymorphisms and familial history of
hypertension.

ABSTRACT

We have investigated the association between the allelic distribution of two polymorphisms of the angiotensinogen (AGT) gene (T174M and M235T in the polypeptide chain), and blood pressure (BP) in a Mediterranean population in the Southwest of Europe.

The study was randomised and stratified with biotopic sampling. The sample consisted of 1,322 participants of urban and rural areas, from the province of Albacete (218,462 inhabitants), located in the Southeast of Spain. The subsample of this study, adjusted by age (more than 18 years old) and sex, consisted of 401 individuals. A case-control study was conducted analysing 205 individuals from the group with the highest BP (fifth quintile) and 196 from the group with the lowest BP (first quintile).

In addition, a comparative and associated analysis of these polymorphisms with BP levels and familial history of hypertension was carried out.

We have found the T174 allele more frequently in the fifth quintile group (without statistical significance). When the presence of threonine was analysed in both polymorphism positions (174 and 235), the genotype TTTT was found to appear more frequently in the fifth quintile than in the first quintile. Moreover, genotype TTTT was significantly more frequent in individuals with familial history of hypertension, indicating that it could be considered a predisposing factor to high BP in individuals from such families. We have also

found that genotype T174M-T235T is more frequent in the first quintile group, and that is almost significantly associated ($p=0.05$) with the group of individuals with no familial history of hypertension.

Key words: angiotensinogen; blood pressure; hypertension; genetic polymorphisms.

INTRODUCTION

Blood pressure is regulated or at least influenced by many genetics, gene-gene, gene-environment, and behavioural factors. Elevated arterial blood pressure, or hypertension, is one of the principal risk factors for cardiovascular disease. The genetic basis of hypertension is complex. Whereas certain monogenic hypertensive syndromes have been described (glucocorticoid-remediable aldosteronism, apparent mineralocorticoid excess, and Liddle syndrome); essential hypertension, where no underlying cause has been identified, is a polygenic disease that has been not solved at the genetic level so far¹⁻³. More than 50 different genes have been implicated as important for the regulation of blood pressure, coding for ion channels, enzymes such as the nitric oxide synthase, and diverse peptides⁴.

The renin-angiotensin system (RAS) is the principal mediator of vasoconstriction, sodium retention, and cellular proliferation, therefore it is thought to play an important role in the regulation of blood pressure. Angiotensinogen (AGT), the first step of the cascade, serves as the substrate for generation of angiotensin I (AI) by renin, a carboxyl-protease that cleaves the Leu¹⁰-Leu¹¹ bond in AGT. Then, AI is converted to angiotensin II (AII) by angiotensin I-converting enzyme (ACE). AII stimulates the secretion of aldosterone and exerts profound pressor and antinatriuretic effects. Since the plasma concentration of AGT is close to the Km of renin for this reaction, it

has been suggested that AGT might be as important as renin in the determination of the rate of generation of AI⁵. Epidemiological surveys have shown a correlation between plasma AGT levels and blood pressure⁶. The AGT gene is located on chromosome arm 1q42-43 and is constituted by five exons and four introns^{7,8}. A **C** \leftarrow **T** transition at the nucleotide 521 in exon 2 causes a sense mutation at amino acid position 174 changing threonine to methionine, and a **T** \leftarrow **C** transition at the nucleotide 704 causes a sense mutation at amino acid 235 changing methionine to threonine⁹. Since in 1992, a large study made in French and Utah families, showed a significant allele frequency difference between hypertensive subjects and unrelated controls, for the two substitutive polymorphisms of the angiotensinogen gene: 174 (T174M) and 235 (M235T)⁹, several case-control studies have been performed in populations of different world areas. In occasions the results of these studies were contradictory. Some of them reported negative results¹⁰⁻¹⁹, but most of them revealed a significant relationship between hypertension and the variant M235T of the angiotensinogen gene^{9,20-27}. Other studies have found a significant association between the allele 235T and a higher plasma concentration of angiotensinogen^{9,28-31}. The contradictory results between different populations when genes related with blood pressure are analysed, emphasise the importance of using homologous populations.

Environmental and behavioural factors affecting individual, familial, populational, or species-wide genetic variants play an important role in quantitative traits, such as blood pressure, and they must be taken into account in order to understand how molecular biology influences hypertension. That justifies the realisation of genetic studies in different populations. In the present study, we have investigated the distribution of the two polymorphisms of the angiotensinogen gene, T174M and M235T, in a Mediterranean population with a characteristic diet and well-defined social habits³², and whether they were associated with high blood pressure. The predicted secondary structures of AGT polypeptide polymorphisms reveal changes in the proportion of beta-sheet conformation. We can reasonably hypothesised if secondary structure of AGT influences the processing efficiency, plasma levels of AGT, and therefore blood pressure.

MATERIALS AND METHODS

Study Subjects

A cross-sectional study of the general population of the Province of Albacete, located in the Southeast of Spain, with a population of 218,462 inhabitants over 18 years of age, and with similar demographic characteristics to the rest of the country, was carried out in order to establish the prevalence of different Cardiovascular Risk Factors. All persons in the sample of more than 18 years of age were included. The sample size was calculated on the basis of a previous survey in which the risk factor with minor expected prevalence was the peripheral artery disease (1.4%)³³. To obtain a confidence interval of 0.9% to 1.9% with respect to the expected prevalence of peripheral artery disease, a total of 2,121 participants was required. The final sample included 1,322 persons, consequence of the decrease in the number of individuals derived from the fact that the study is made in general population and not in patients. The loss of individuals does not imply loss of statistic significance. The random stratified sample was examined in two phases with sample sizes proportional to the sizes of the local population, i.e., 40% of participants were from the capital (urban area), 23.1% from towns of more than 10,000 inhabitants (small urban areas), and 36.9% from towns and villages of less than 10,000 inhabitants (rural areas). During the first phase of the study,

participants in each group were selected at random from 22 population zones, whereas in the second phase, participants were selected by systematic random sampling and then contacted.

Baseline information was collected with the use of previously designed questionnaires³⁴. This included personal and family history of cardiovascular diseases (we defined familial history of an individual if his father, mother or brothers are hypertensive), and risk factors such as tobacco, stress, sedentary life, etc. After completion of the questionnaires, the patient's weight, height and blood pressure (BP) were registered. BP was measured following the recommendations of the British Society of Hypertension in the sitting position after 15 minutes of rest using a conventional mercury sphygmomanometer. The lower of two measurements taken 5 min apart was selected for the study. Systolic and diastolic BP were defined as being the first and fifth Korotkoff sounds, respectively. Seven observers who were previously trained and passed a certification test with a double-headed stethoscope and a video-test conducted the study; this certification was repeated every three months.

We selected for this study, a subsample, adjusting by age (decades) and sex, of 205 participants with the highest BP values (fifth quintile group, 138/79.8 mm Hg), and compared with 196 participants with the lowest BP levels (first quintile group, 117.3/72.1 mm Hg), establishing a case-control study from the cross-sectional survey

previously described. Note that the decrease in the theoretical number of individuals for each quintile (264) is due to the nature of the study, as commented before (Table 1).

In these two groups we studied two genetics variants (T174M and M235T), of the angiotensinogen gene by polymerase chain reaction (PCR), combined with restriction analysis of the PCR product.

Experimental Procedures

For genotype analysis, genomic DNA was extracted according previously to a reported technique³⁵ instructions. The primers used for AGT amplification were as follows: primer A (sense) 5'-GATGCGCACAAGGTCCTGTC-3'; primer B (antisense) had a 40-bp GC-clamp attached 5'-CGCCCGCCCCGCCCCGCCGCCCCGCCCCGCCCCGCCGCCCCGC-TGCTGTCCACACTGGCTCGC-3', as described by Rutledge et al.³⁶. The PCR product was 338 bp long. The 60-bp length of primer B was designed to insure visualisation of the fragments by agarose electrophoresis, after digestion with the *NcoI* and *BstUI* restriction enzymes.

The two point mutations, in nucleotides +521 (T174M) and +704 (M235T), both of the second exon of the gene, were detected using restriction analysis of a mispairing PCR product³⁶. A naturally occurring *NcoI* restriction site was present in the codon 174 only in

the mutated genotype (M). The M235T mutation was detected using a BstUI restriction site that was created by the mispairing primer method used in the PCR reaction. The various digested fragments were then visualised by electrophoresis on a 2.0% agarose gel stained with ethidium bromide.

PCR reaction was performed using 2.5 U of Taq polymerase (Perking-Elmer Cetus), 200-400 ng of DNA template, 40 pmol of each primer, 125 μ mol/L of each dNTP, 50 mmol/L KCl, 10 mmol/L tris HCL (pH 8,3), 1.5 mmol MgCl₂, and 0.01 % wt/vol gelatine. The reaction cycled 35 times (94°C denaturation for 30 sec, 64°C annealing for 30 sec, and 72°C extension for 2 min). Finally, the reaction was kept at 72°C for 10 min to allow Taq polymerase to finish any extension.

Aliquots of the PCR reaction were used for the NcoI and BstUI (both from New England Biolabs) digestions. Digestions were performed at 37°C for NcoI and at 60°C for BstUI, for 2h using a 30- μ l volume reaction. The mispairing primer (primer B) creates the BstUI restriction site only in the mutated form of position 235 (235T).

Protein secondary structure prediction was performed using the program from the Skirball Institute of Biomolecular Medicine: Frishman multi-layered method.

(<http://saturn.med.nyu.edu/searching/Sspred/queryss.html>).

Statistical analysis

Differences between variables in the first and fifth quintiles were examined through the use of t test and Chi-square statistics. Statistical significance was noted if a computed two-tailed probability value was less than 5% ($p < 0.05$). The SPSS PC+ computer program, Statcalc of Epiinfo, 5.1 was used for statistical analysis.

We used the Kolmogorov-Smirnov Test to verify that the data were normally distributed

RESULTS

In this study, allelic frequencies were in Hardy-Weimberg equilibrium for the AGT polymorphisms.

When we compared individually each genotype distribution of the polymorphisms in the two groups we did not detect any significant relationship between M235T variants and blood pressure (Table 2).

We also studied the presence of both polymorphisms (174 and 235) in each individual; in order to analyse the relationship between the amino acid substitutions in the preangiotensinogen polypeptide and blood pressure values. The frequency of genotype T174T-T235T in the fifth quintile was higher than in the group with lower pressure (Table 3), although the difference was not statistically significant. The frequency of genotype T174M-T235T is higher in the first quintile group, but not statistically significant (Table 3).

Between the nine possible combinations the genotypes M174M-M235M, T174M-M235M and M174M-M235T were not found in our population.

The relationship between angiotensinogen genotypes and familial history of hypertension was also analysed. It was found a significant and strong association between familial antecedents of hypertension and the genotype T174T-T235T (Table 4), indicating that this genotype could be considered as a predisposing factor for the development of high BP in individuals with familiar antecedents of hypertension.

The genotype T174M-T235T in the first quintile group is near significance if familial antecedents of hypertension and this genotype frequency are compared (Table 4). This genotype is almost significantly associated ($p=0.05$) with the group of individuals with no familial history of hypertension.

We observed a significative difference between BMI and W/H ratio and the first and fifth quintiles ($p<0.001$) (Table 1)

DISCUSSION

Angiotensinogen is the first step of the cascade renin-angiotensin system, for this reason the studies of genetic variation in this polypeptide are a subject of interest. From among the numerous studies made with genes of the renin-angiotensin system, is the AGT gene where researches have found relationships between gene structure and blood pressure more frequently.

In 1992, a pioneer investigation of AGT gene variants in 215 sibships from American and French populations reported an association between two polymorphisms, of the fifteen studied, and high blood pressure. These two polymorphisms corresponded to sequences present in the second exon of the gene and were named: T174M and M235T⁹. Since that, a large number of populations have been tested for these two variants, most of them showing a positive relationship between the 235T variant and hypertension^{20-27,30}. However, other studies performed in different populations did not found any relationship between these two variables¹⁰⁻¹⁹. In the case of variants in 174 position the number of associations with blood pressure is not so high^{9,37,38}.

To our knowledge, this is the first analysis of the relationship between the two AGT polymorphisms and BP. We have made this approach since we estimate that it has biological meaning regarding structure-function relationship. The deduced amino acid sequence from the cloned cDNA, shows that the angiotensinogen molecule

consist of 452 amino acid residues with the angiotensin II sequence at its amino terminal portion^{7,39}. Comparison of predicted secondary structures of the angiotensinogen polypeptide polymorphisms shows that the region containing amino acid position 174 increased the proportion of beta-sheet conformation in the T174 variant. In the case of position 235, a beta region that is not present in the case of M235 characterises the variant 235T (Figure 1).

Although speculative, we can propose that this change in the protein conformation of the angiotensinogen (452 amino acids) could influence the cleavage by renin to produce the decapeptide angiotensin I. There is no known function for the remaining 442 amino acids contained in AGT⁴. It could be possible that secondary structure influences the processing efficiency and then plasma levels of AGT. Supporting this hypothesis, a strong association between variant 235T and high plasma level of AGT has been reported^{9,28-31}. In addition Cohen and co-workers⁴⁰ had suggested that the variant 235T triggers a conformational modification of the angiotensinogen molecule sufficient to be detectable by specific monoclonal antibodies. The association between TTTT genotype and familial antecedents of hypertension suggests that this genotype could represent a factor predisposing to high BP values. The presence of a threonine at position 174 of AGT polypeptide chain is associated to familial history of hypertension whereas a methionine is related with no familial history of hypertension.

As occurs in our study, it is not unexpected that the population with the higher BMI and W/H ratio should also have a higher BP. Aspects of body habitus (weight, skinfold thickness, body mass index, waist to hip ratio) are frequently found to be positively associated with BP (see reviews ⁴¹⁻⁴²). A variety of genetic and environmental factors contribute to blood pressure variation, even in single individuals. We are of the opinion that body habitus could play a significant impact upon our study, even higher than the genetic determinants studied. It must be taken into account that BP is likely to be a polygenic character that results from the inheritance of a number of genes including those influencing phenotypic quantitative traits.

It has been reported that age could modulate the influence of AGT genetic variation on BP levels. We have not detected a significative association between the AGT genotypes or alleles frequencies studied and BP in persons less than 50 years of age.

Disagreements with results of other Caucasians populations emphasised the importance of using homologous populations in studies comparing AGT gene variants. Altogether these studies could contribute to create a map of the distribution of AGT allelic frequencies and the plausible influence of genetic and epigenetic factors on BP. For instance, one can speculate if Mediterranean diet and social habits could play a role disguising the genetic predisposition effect, if exist, to present high blood pressure. It is known that as Willett and co-workers describe "*The Mediterranean*

diet constitutes a centuries-old tradition that contribute to excellent health, provides a sense of pleasure and well-being"³².

4. Gertler D, Durrant G. The Molecular Basis of Hypertension. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 127-45.

7. Gertler D, Gertler G. Hypertension: A genetic disease. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 127-45.

8. Gertler D, Gertler G. Hypertension: A genetic disease. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 127-45.

9. Gertler D, Gertler G. Hypertension: A genetic disease. *Ann Rev Biochem* 1999; 68: 127-45.

Acknowledgements

This work was supported by a grant from the "Fondo de Investigaciones Sanitarias" (F.I.S. 97/2123). EM was recipient of fellowships from the "Cultural Albacete" Public Consortium and the "Caja Castilla-La Mancha" Savings Bank. The authors wish to thank Amelia Vidal her help in processing blood samples and to Manuel Álvarez-Ortí for assistance in confection of the figure.

Note

We dedicate this article in memoriam to Dr Angel Puras, M.D., Ph.D., who died on 8 March 2001, aged 44. Dr. Puras was head of the departments of medicine at the hospitals of Soria, Albacete and Alcorcón (Madrid), and chairman of the Group of Vascular Diseases of Albacete (GEVA) until recently. Dr. Puras was responsible for the initiation and development of the studies on genetics of hypertension in our group. We deeply regret his untimely death.

REFERENCES

1. Lifton RP. Molecular Genetics of human Blood Pressure Variation. *Science*. 1996; **272**: 676-680.
2. Luft FC. Molecular genetics of human hypertension. *J Hypertens*. 1998; **16**: 1871-1878.
3. Crews DE, Williams SR. Molecular Aspects of Blood Pressure Regulation. *Hum Biol*. 1999; **71**(4): 475-503.
4. Garbers DL, Dubois SK. The Molecular Basis of Hypertension. *Ann Rev Biochem*. 1999; **68**: 127-155.
5. Reid IA, Morris BJ, and Ganong WF. The renin angiotensin system. *Ann Rev Physiol* 1978; **40**: 377-410.
6. Walker WG, Whelton PK, Saito H, Russel RP, Hermann J. Relation between blood pressure and renin, renin substrate angiotensin II, aldosterone and urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1979; **1**: 287-291.
7. Gaillard I, Clauser E, Corvol P. Structure of human angiotensinogen gene. *DNA* 1989; **8**: 87-89
8. Gaillard-Sanchez I, Mattei MG, Clauser E, Corvol P: Assignment by *in situ* hybridization of the angiotensinogen gene to chromosome band 1q4, the same region as the human renin gene. *Human Genet* 1990; **84**: 341-343.
9. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A, Hunt SC, Hopkins PN, Williams RR, Lalouel JM,

- Corvol P. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell*. 1992; **71**: 169-180.
10. Bennett CL, Schrader AP, Morris BJ. . Cross-sectional analysis of Met235⇒Thr variant of angiotensinogen in severe hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1993; **197**: 833-839.
11. Barley J, Blackwood A, Sagnella G, Markandu N, MacGregor G, Carter N J *et al*. Angiotensinogen Met235⇒Thr polymorphism in a London normotensive and hypertensive black and white population. *J Hum Hypertens* 1994; **8**: 639-640
12. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark A. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Eng J Med* 1994; **330**: 1629-1633.
13. Rotimi C, Morrison L, Cooper R, Oyejide C, Effiong E, Ladipo M, Osotemihen B, Ward R *et al*. Angiotensinogen Gene in Human Hypertension. Lack of an association of the 235T allele among African Americans. *Hypertension* 1994; **24**: 591-594.
14. Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Variation of the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet* 1995; **96**: 295-300.
15. Tiret L, Sylvain R, Poirier O, Arveiler D, Cambou J-P, Luc G, Evans A, Nicaud V, Cambien F. Genetic variation at the angiotensinogen locus in relation to high blood pressure and

- myocardial infarction: the ECTIM study. *J Hypertens*. 1995; **13**: 311-317.
16. Doria A, Onuma T, Gearin G, Freire MBS, Warram JH, Krolewski AS. Angiotensinogen Polymorphism M235, Hypertension, and Nephropathy in Insulin-Dependent Diabetes. *Hypertension* 1996; **27**: 1134-1139.
17. Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ. Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 1996; **28**: 907-911.
18. Fernandez-Llamas P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert. L Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphism in essential hypertension. Relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 1998; **11**: 439-444.
19. Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Cittero L, Grobbee D. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension: a European study. *Hypertension*. 1998; **31**: 725-729.
20. Hata A, Namikawa C, Saski M, Sato K, Nakamura T, Tamura K. Angiotensinogen as a risk factor for essential hypertension in Japan. *J Clin invest*. 1994; **93**: 1285-1287.
21. Kamitani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Mikami H, Miki T, Ogiwara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens*. 1994; **8**: 521-524.

22. Jeunemaitre X, Charru A, Chatellier G, Dumont C, Sassano P, Soubrier F, Menard J, Corvol P. M235T variant of the human angiotensinogen gene in unselected hypertensive patients. *J Hypertens* 1993; **11**(suppl 5): S80-S81.
23. Johnson, AG, Simons LA, Friedlander Y, Simons J, David DR, MaCallum J. M235 \Rightarrow T polymorphism of the angiotensinogen gene predicts hypertension in elderly. *J Hypertens* 1996; **14**: 1061-1065.
24. Jeunemaitre X, Inoue I, Williams C, Charru A, Tichet J, Powers M, Sharma AM, Gimenez-Roqueplo A-P, Hata A, Corvol P, Lalouel J-M. Haplotypes of angiotensinogen in essential hypertension. *Am J Hum Genet* 1997; **60**: 1448-1460.
25. Krizanová O, Obdržálková D, Poláková H, Jelok I, Hudecová S. Molecular variants of renin-angiotensin system components in the Slovak population. *Physiol Res* 1997; **46**: 5, 357-361.
26. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites. A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997; **30**: 1331-1337.
27. Kato N, Sugiyama T, Morita H, Yamori Y, Yakazaki Y. Angiotensinogen gene and essential hypertension in the Japanese: extensive association study and meta-analysis on six reported studies. *J Hypertens* 1999; Jun, **17**:6, 757-763.

28. Ward K, Hata A, Jeunemaitre X, Helin C, Nelson L, Namikawa C, Farrington P, Ogasawara M, Suzumori K, Tomoda S, Berrebi S, Sasaki M, Corvol P, Lifton RP, Lalouel JM. A molecular variant of angiotensinogen associated with preclamsia. *Nat Genet* 1993; **4**: 59-61.
29. Bloem LJ, Manatunga AK, Tewksbury DA, Pratt JH. The serum angiotensinogen concentration and variants of the angiotensinogen gene in white and black children. *J Clin Invest* 1995; **95**: 948-943.
30. Rotimi C, Cooper R, Ogumbiyi O, Morrison L, Ladipo M, Tewksbury D, Ward R. Hypertension, serum angiotensinogen, and molecular variants of the angiotensinogen gene among Nigerians. *Circulation* 1997; **95**: 10, 2348-2350.
31. Danser AH, Derkx FH, Hense HW, Jeunemaitre X, Riegger GA, Schunker H. Angiotensinogen (M235) and angiotensin-converting enzyme (I/D) polymorphism in association with plasma renin and prorenin levels. *J. Hypertens* 1998; **16**: 12 Pt 2, 1879-1883.
32. Willet WC, Sacks F, Trichopoulou A, Drescher G, Ferro-Luzzi A, Helsing E, Trichopoulos D. Mediterranean diet pyramid: a cultural model for healthy eating. *Am J Clin Nutr* 1995; **61**(suppl): 1402S-6S.
33. Artigao M. Enfermedades cardiovasculares y sus factores de riesgo en población general de Albacete. El corazón en la comunidad. PhD Thesis, Universidad Autónoma de Madrid, 1998

34. Puras A, Sanchis C, Artigao LM, Divison JA. Prevalence, awards, treatments and control of hypertension in a Spanish population. *Eur J Epidemiol* 1998; **14** (1): 31-36.
35. Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchis C, Carrión L, Artigao M, Divison JA, Massó J, Vidal A, Fernández JA. Angiotensin – converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens*. 2000; **14**: 131-135.
36. Rutledge DR, Browe CS, Kubilis PS, Ross EA. Analysis of two variants of the angiotensinogen gene in essential hypertensive African-Americans. *Am J Hypertens* 1994; **7**: 651-654.
37. Hegele RA, Brunt H, Connelly PW. A polymorphism of the angiotensinogen gene associated with variation in blood pressure in a genetic isolate. *Circulation* 1994; **90**: 2207-2212.
38. Chistiakov DA, Turakulov RI, Moiseev VS, Nosikov VV. Polymorphism of angiotensinogen T174M gene and cardiovascular diseases in the Moskow population. *Genetika* 1999; **35**: 8, 1160-1164.
39. Kageyama R, -Ohkubo H, Nakanishi S. Primary structure of Human Preangiotensinogen Deduced from the Cloned cDNA Sequence. *Biochemistry* 1984; **23**: 3603-3609.
40. Cohen P, Badouaille G, Gimenez-Roqueplo AP, Mani J-C, Guyene T-T, Jeunemaitre X, Menard J, Corvol P, Pau B, Simon D. Selective recognition of M235T angiotensinogen variants and

their determination in human plasma by monoclonal antibody-based immunoanalysis. *J Clin Endocrinol Metab.* 1996; **81**: 3505-3512.

41. Hamet P, Pausova Z, Adarichev V, Adaricheva K, Trenblay J. Hypertension: Genetics and environment. *J Hypertens.* 1998; 16:397-418.

42. Crews DE, Williams SR. Molecular Aspects of Blood Pressure Regulation. *Human Biology.* 1999; 71(4): 475-503.

Table 1. Age, sex, systolic blood pressure, diastolic blood pressure, body mass index and waist/hip ratio: mean (standard deviation) an percentages of the two quintiles of the study.

	Age (years)	Sex (% male)	SBP (mm Hg)	DBP (mm Hg)	BMI	W/H ratio
1st quintile	50.4 (17.8)	44.7	117.3 (16.5)	72.1 (10)	26.3 (4.3)	0.85 (0.09)
5th quintile	51.6 (17.9)	47.9	138* (21.4)	79.8* (12.1)	29.1* (5)	0.89* (0.08)
<p>* p<0.001 between groups.</p> <p>SBP: systolic BP; DBP: diastolic BP; BMI: body mass index and W/H ratio: waist/hip ratio.</p>						

Table 2. AGT genotype distribution and allele frequencies of the M235T and T174M polymorphisms in the first and fifth quintiles of the studied population.

GENOTYPES No. (%)							ALLELES No. (Freq.)			
GROUPS	M235M	M235T	T235T	M174M	M174T	T174T	M235	235T	174M	T174
1 st quintile (n=196)	53 (27)	102 (52)	41 (21)	3 (1.5)	51 (26.1)	142 (72.4)	208 (0.531)	184 (0.469)	57 (0.145)	335 (0.855)
5 th quintile (n=205)	64 (31)	104 (51)	37 (18)	1 (0.5)	40 (19.5)	164 (80)	232 (0.566)	178 (0.434)	42 (0.102)	368 (0.898)
p= 0.56 N.S.							p= 0.316 N.S.			

n: number of individuals. N.S.: No significant differences.

Table 3. AGT genotype distribution of the T174T-T235T and T174M-T235T polymorphisms in the first and fifth quintiles of the studied population.

GROUPS	T174T-T235T	Other genotypes*	T174M-T235T	Other genotypes**
1 st quintile (n=196)	17 (8.7)	179 (91.3)	21 (10.7)	175 (89.3)
5 th quintile (n=205)	24 (11.7)	181 (88.3)	12 (5.9)	193 (94.1)
p=0.316 N.S.			p=0.148 N.S.	

n: number of individuals. N.S.: No significant differences

*T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T, T174M-T235T, T174M-T235T and M174M-T235T.
**T174T-T235T, T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T, T174M-T235T and M174M-T235T.
Please note that genotypes M174M-M235M, T174M-M235M and M174M-M235T were not found in the studied population.

Table 4. AGT genotype distribution of the T174T-T235T and T174M-T235T polymorphisms according to familial history of HTN.

Genotypes No (%)			
	T174T-T235T	Other genotypes*	T174M-T235T Other genotypes**
No familial history of HTN. (n=294)	24 (8.2)	270 (91.8)	27 (9.2) 267 (90.9)
Familial history of. HTN (n=107)	17 (15.9)	90 (84.1)	6 (5.6) 101 (94.4)
p=0.024 S.D p=0.05072 N.S.			

S.D.: Significant difference; N.S.: No significant difference
HTN: hypertension; n: number of individuals.
*T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T, T174M-T235T and M174M-T235T.
**T174T-T235T, T174T-M235M, T174T-M235T, T174M-M235T and M174M-T235T.
Please note that genotypes M174M-M235M, T174M-M235M and M174M-M235T were not found in the studied population.

LEGENDS TO FIGURE

Figure 1. Secondary structure prediction of AGT 174 and 235 polymorphisms according to Frishman multi-layered method.

LEGENDS TO FIGURE

Figure 1. Secondary structure prediction of AAT 17-20 using the method according to Fasman and co-workers.

Figure 1. Secondary structure prediction of AAT 17-20 using the method according to Fasman and co-workers.

TÍTULO

Polimorfismos genéticos del sistema renina angiotensina e hipertensión arterial esencial

TITLE

Genetic polymorphisms of the renin angiotensin system and essential hypertension

Grupo Español de Genética e Hipertensión Arterial de la Sociedad Española de Hipertensión/Liga Española para la Lucha contra la Hipertensión Arterial*

**los autores se detallan en el apéndice*

Correspondencia: Dr Esteban Poch

Servicio de Nefrología, Hospital Clínic
Villarroel 170, 08036 Barcelona
Tel: (93) 227 5444
Fax: (93) 227 5444
email: epoch@medicina.ub.es

INTRODUCCIÓN

En los estudios encaminados a investigar el papel de la genética en la etiología de la hipertensión arterial (HTA) esencial en los últimos años, el sistema renina angiotensina (SRA) ha sido, con diferencia el más estudiado (1). Esto se debe a que el SRA tiene una participación fundamental en el control de la presión arterial (PA) y por ello, los genes que codifican cada uno de sus componentes son candidatos firmes en la etiología de la HTA esencial.

Los dos polimorfismos más estudiados son el I/D del gen de la enzima de conversión de la angiotensina (ECA) y el M235T del gen del angiotensinógeno (AGT). Ambos polimorfismos se caracterizan por determinar de alguna manera la actividad de las proteínas que codifican. Así, el polimorfismo I/D de la ECA, consistente en la presencia (I) o ausencia (D) de un fragmento de 287 pb en el intrón 16 del gen (2) determina alrededor de un 50% de la variación de los niveles de ECA plasmáticos. El genotipo DD se asocia a los niveles más elevados y el genotipo II a los niveles más bajos, mientras que los sujetos heterocigotos muestran niveles intermedios (2). Esta regulación parece extenderse asimismo a los niveles tisulares de ECA (3) que serían capaces de estimular la generación local de angiotensina II (4). Por otro lado, el polimorfismo M235T del gen del angiotensinógeno determina en parte los niveles plasmáticos de AGT (5), niveles que se correlacionan con las cifras de PA (6, 7). En este caso, los pacientes con genotipo TT tienen los niveles más altos, mientras que los pacientes MM tienen los niveles más bajos.

Aunque la asociación entre el gen de la ECA y el gen del AGT con la HTA esencial se ha demostrado en varias poblaciones existe, sin embargo, cierta controversia según la población estudiada. Así, el polimorfismo I/D de la ECA se asoció inicialmente con HTA esencial (8), aunque estudios de ligamiento (5) y la mayoría de estudios de asociación han sido negativos (1), incluidos los realizados en población española con muestras relativamente reducidas (9-12). Estudios más recientes parecen demostrar de forma convincente que, al menos en la población norteamericana, el genotipo DD se asocia a HTA y a niveles más elevados de presión arterial en varones pero no en mujeres (13, 14). Además, el genotipo DD también se ha asociado a otras enfermedades cardiovasculares como hipertrofia ventricular e infarto de miocardio (15-17), nefroesclerosis (18), aunque también con discrepancias según la población estudiada (19, 20). Por otro lado, el gen del AGT se halla en ligamiento genético con HTA esencial en un estudio utilizando pares de hermanos

hipertensos (5) y además, el alelo T del polimorfismo M235T en el mismo gen, se encuentra asociado a HTA esencial (5). Este hallazgo se ha corroborado en diversos metanálisis, que confieren un riesgo de entre un 20 y un 31% de HTA asociado a la presencia del alelo T (21, 22). Por el contrario, el alelo T no parece asociarse a lesión de órgano diana (23, 24).

Estas discrepancias pueden deberse a que los efectos esperados sobre la presión arterial (PA) de cada gen por separado sean pequeños. Estudios epidemiológicos y en familias indican que cerca del 30% de la variación individual de la PA está determinada genéticamente (25). No obstante, la HTA esencial es una enfermedad compleja poligénica, determinada por genes que interaccionan entre sí y con factores ambientales (25, 26). Así, existe la posibilidad de que diversos *loci* genéticos ejerzan un efecto aditivo o sinérgico en determinar la PA. De esta manera, se han descrito efectos sinérgicos de diferentes polimorfismos, incluido el I/D de la ECA para determinar mayor riesgo de HTA (21). El presente trabajo tiene por objetivo por un lado, estudiar la posible asociación entre el polimorfismo I/D de la ECA y el M235T del AGT con la HTA esencial en una muestra amplia de pacientes afectados de HTA procedentes de diversas unidades de hipertensión españolas debido a que estudios previos en nuestro medio se han realizado con muestras relativamente pequeñas. Por otro lado, se investiga un posible efecto sinérgico entre estos polimorfismos para determinar el valor de PA.

MATERIAL Y MÉTODOS

Selección de sujetos.

En este estudio se han incluido pacientes afectados de hipertensión arterial que procedentes de cinco unidades de hipertensión en España (Albacete, Barcelona, Las Palmas, Sevilla y Valencia) que constituyen el grupo de trabajo de Genética e Hipertensión de la Sociedad Española de Hipertensión. Se definió HTA por valores de PA sistólica > de 140 mm de Hg o una PA diastólica > de 90 mm de Hg en al menos 3 determinaciones y se incluyeron pacientes de edad superior a 21 años. Como grupo control se incluyeron individuos sanos sin antecedentes familiares ni personales de hipertensión y con cifras normales de presión arterial, que fueron ajustados por sexo a la muestra de pacientes hipertensos.

Todos los individuos incluidos en el estudio eran de raza blanca. El estudio fue aprobado por el comité ético de los diferentes centros y los pacientes dieron su consentimiento escrito para formar parte del estudio.

Determinación del genotipo de los polimorfismos del gen de la ECA y del gen del AGT

Se realizó la amplificación de DNA genómico mediante la reacción en cadena de la polimerasa (PCR), seguida de una digestión con enzimas de restricción en el caso de los polimorfismos del AGT. El DNA genómico se extrajo de leucocitos de sangre periférica siguiendo las técnicas habituales.

Polimorfismo I/D de la ECA. La PCR se realizó en un volumen de 25 µl que contenía: 1,5 mM de MgCl₂, 50 mM KCl, 10 mM Tris-HCl pH 8,3, 200 µM de cada dNTP, 1U de Taq polimerasa (*Boehringer Mannheim, Alemania*), 100 ng de DNA genómico, y 1 µM de cada primer o cebador: 5' CTG GAG ACC ACT CCC ATC CTT TCT 3' y 5' GAT GTG GCC ATC ACA TTG GTC AGA T 3' (2). Se realizó una primera desnaturalización a 96°C durante 5 minutos seguida de 35 ciclos que consistían cada uno en: desnaturalización a 94°C durante 30 segundos, hibridación a 58°C durante 30 segundos y extensión a 72°C durante 1 minuto finalizando el proceso con una extensión a 72°C durante 5 minutos. Los cebadores flanquean la región polimorfa y permiten identificar un fragmento de 490 pb que corresponde a la inserción (I) y otro fragmento de 190 pb que corresponde a la delección (D). Los individuos fueron clasificados como genotipo II, DD o heterocigoto para la I/D. Se ha descrito la posibilidad de un error en la clasificación de los heterocigotos DI como DD hasta en un 10% de casos y se produce por una amplificación preferente del alelo D y

una inadecuada amplificación del alelo I (27). Por este motivo, se realizó una segunda amplificación en todas las muestras clasificadas inicialmente como genotipo DD. Los cebadores que reconocen específicamente la secuencia de la inserción son: 5' TGG GAC CAC AGC GCC CGC CAC TAC 3' y 5' TCG CCA GCC CTC CCA TGC CCA TAA 3' (28). La PCR se realizó con las mismas condiciones que en el caso anterior a excepción de una temperatura de hibridación de 64°C. En presencia del alelo I el producto de la reacción es de 335 pb. La separación de los fragmentos se realizó mediante electroforesis en gel de agarosa (0,5% de agarosa mas 2,5% de Nu.Sieve) (Amersham, Arlington Heights, IL, E.E.U.U.) visualizándose los fragmentos con un transiluminador ultravioleta después de la tinción con bromuro de etidio.

Polimorfismo M235T del gen del AGT. La PCR se realizó en las mismas condiciones que en el apartado anterior a excepción de una temperatura de hibridación de 61°C. Los cebadores utilizados fueron: 5' TGG ATG CGC ACA AGG TCC TGT C 3' y 5' CAG GGT GCT GTC CAC ACT GGC TCG C 3' (29). El segundo cebador, durante la amplificación, cambia un nucleótido creando una zona de restricción para el enzima *Sfa*NI (New England Biolabs, Beverly, MA, E.E.U.U.). La digestión del producto de la PCR con el enzima *Sfa*NI a 37°C durante 4 horas produce un fragmento de 266 pb si el codón 235 es ATG (M235). Sin embargo, no digiere el producto de la amplificación de 303 pb si la variante es la T235.

Análisis estadístico

Las variables cuantitativas se expresan como media \pm desviación estandar (DS). Debido a que existe dimorfismo sexual en la asociación entre el polimorfismo de la ECA e HTA, los análisis se han realizado considerando por separado varones y mujeres. La distribución de genotipos y la frecuencia de alelos se comparó entre los grupos mediante el test de χ^2 o el test de Fisher. Las diferencias entre las variable cuantitativas se analizaron mediante tests paramétricos (análisis de la varianza). En el caso de que la distribución no fuera normal se aplicó un test no paramétrico (Kruskal-Wallis). Para el análisis del posible efecto sinérgico de los polimorfismos del SRA sobre el grado de PA se ha aplicado un *Two-Way ANOVA* con una variable dependiente (PA) y dos factores (polimorfismo I/D de la ECA y polimorfismo M235T del AGT). Un valor de $p < 0,05$ fue considerado significativo.

RESULTADOS

Las características clínicas de los sujetos incluidos en el estudio se muestran en la tabla 1, donde se separan por sexos. Con respecto a los sujetos controles, los pacientes hipertensos, tanto varones como mujeres, presentaban una PA y un IMC significativamente más elevados. Con respecto a la edad, existían diferencias significativas, aunque de magnitud discreta, entre pacientes y controles.

La distribución de los genotipos del polimorfismo I/D del gen de la ECA, así como la frecuencia de alelos, en los pacientes hipertensos no difería significativamente de la distribución en el grupo control, tanto en varones como en mujeres (Tabla 2). Asimismo, la distribución de los genotipos y la frecuencia de alelos del polimorfismo M235T del gen del AGT en los pacientes hipertensos tampoco difería significativamente de la distribución en el grupo control, tanto en varones como en mujeres (Tabla 2). En la tabla 3 se muestran las características clínicas principales de los pacientes hipertensos según el sexo y los genotipos I/D y M235T. No existían diferencias en cuanto a la edad, IMC y cifras de presión arterial, tanto en varones como en mujeres, según los diferentes genotipos de la ECA y del AGT. Existe la asunción de que en la HTA grave, sobre todo la de aparición a edad temprana, los factores genéticos adquieren un mayor protagonismo. De esta manera, se evaluó la distribución de los genotipos y la frecuencia de alelos del polimorfismo I/D y M235T en pacientes hipertensos con una HTA severa (grado III, $PA \geq 180$ y/o ≥ 110 mm Hg). Sin embargo, en nuestro estudio no se encontró asociación en la distribución de los genotipos y la frecuencia de alelos de los polimorfismos del SRA con HTA entre este subgrupo de pacientes (datos no mostrados). Todos estos resultados se obtuvieron al aplicar el modelo genético aditivo (p. ej. DD vs DI vs II), y los resultados no variaban tanto si alternativamente se aplicaba para los alelos D de la ECA o T del AGT el modelo recesivo (p. ej. DD vs DI + II) o dominante (p.ej. DD+DI vs II) (datos no mostrados).

Finalmente, para valorar un posible efecto aditivo del gen de la ECA y del gen del AGT en determinar el valor de la PA, se analizó la interacción de los polimorfismo I/D de la ECA y M235T del AGT sobre el nivel de PA tanto en los pacientes con HTA. Como se observa en la tabla 4, en nuestra muestra no se observó asociación entre ninguna combinación de los genotipos analizados con los niveles de PA, tanto sistólica como diastólica.

DISCUSIÓN

En este estudio hemos analizado la asociación entre dos polimorfismos genéticos de la ECA y del AGT con HTA en una muestra amplia de pacientes procedentes de cinco unidades de hipertensión. No se ha hallado ninguna asociación entre estos polimorfismos e HTA así como ningún efecto, ya sea de forma aislada como conjunta, sobre las cifras de PA en los pacientes hipertensos.

A pesar de la relación entre el polimorfismo I/D y los niveles de ECA en humanos, se han realizado diferentes estudios, que como el nuestro, no han podido demostrar una asociación entre este polimorfismo y la PA (5, 30). Entre los estudios que han mostrado asociación, curiosamente se ha observado una asociación entre el alelo I y la HTA en una población australiana (8). Se ha especulado que este resultado podría ser debido a un déficit de alelos D en la población hipertensa mayor como consecuencia de la pérdida de pacientes DD por muerte precoz. Aunque, se ha considerado que la reproducibilidad en poblaciones de etnia diferente es importante, hay que tener en cuenta que resultados dispares en diversas etnias pueden deberse a diferencias en la distribución de genotipos en las poblaciones control. Por otro lado, cabe señalar que el único estudio de ligamiento utilizando pares de hermanos hipertensos fue negativo (31). No obstante, estudios más recientes han demostrado una asociación entre el alelo D y la HTA así como con las cifras de presión arterial en sujetos varones pero no en mujeres (13, 14), sugiriendo la existencia de un dimorfismo sexual en el efecto del polimorfismo I/D de la ECA. Por ello, en nuestro estudio hemos considerado por separado a varones y mujeres. A pesar de ello, los resultados han sido negativos. Por otro lado, también habría que destacar que el polimorfismo I/D es, en realidad, un marcador genético que se encuentra fuertemente ligado ("desequilibrio de asociación") a una variante funcional localizada dentro o muy cerca del gen de la ECA y cuya identidad molecular se desconoce por el momento (32, 33). Por lo tanto, al no tratarse de un polimorfismo patogénico sino de un marcador, estaría sujeto a variabilidad en cuanto asociación a la enfermedad. Otra hipótesis que se baraja es que el intrón podría contener una región reguladora de características similares a secuencias silenciadoras, y así la inserción actuaría como un "silenciador, explicando una menor transcripción del gen y por ello menos actividad enzimática en individuos con el alelo I (34, 35).

Existen diversas evidencias que sugieren la existencia de una relación entre los niveles de AGT plasmático y la PA. Los hipertensos tienen niveles plasmáticos de

AGT más altos que los controles y éstos más bajos que los hijos de hipertensos (6). La asociación entre el alelo T del polimorfismo M235T del AGT con HTA parece que es un fenómeno más generalizado, según los resultados de algunos metanálisis (21, 22). Esta asociación era especialmente evidente en pacientes con HTA grave o con aparición temprana de la enfermedad. Aunque, no se ha demostrado que estas variantes modifiquen la cinética del SRA, el polimorfismo M235T se ha encontrado asociado con niveles más elevados de AGT plasmático (5). Recientemente, se ha identificado un "desequilibrio de asociación" entre el polimorfismo M235T y las variantes A-20C y C-18T. Estas variantes parece que juegan un papel fundamental en la regulación de la transcripción del gen del AGT (36). Aún así, hay disparidad de resultados según la población que se analiza (22, 37-40). Algunos trabajos han demostrado la asociación con el polimorfismo M235T únicamente cuando se analizaban pacientes con aparición temprana de la HTA (41) o con una historia familiar de la enfermedad (41). Curiosamente, los resultados negativos se han encontrado sobre todo en poblaciones no blanca (22, 40, 42-44) atribuyéndose la diferencia en la frecuencia de los alelos del AGT al trasfondo genético. A esto se deben añadir posibles problemas metodológicos relacionados con el diseño del estudio como causa de estas discrepancias, por ejemplo diferencias en la clasificación de pacientes hipertensos y normotensos al tomar la PA como una variable discontinua, en lugar de analizarla como variable continua. A pesar de ello, en dos recientes trabajos, la PA se ha analizado como variable continua no observándose asociación entre la PA y la variante M235T, incluso después de ajustar la PA por variables de confusión (la edad, el sexo, el índice de masa corporal o la ingesta de alcohol) (39, 45). Hay que tener en cuenta, sin embargo, que cuando se analiza la PA como una variable continua la obtención de un resultado negativo puede explicarse porque la contribución del AGT en la PA es débil.

Un problema importante de la mayoría de estudios es la posibilidad de error estadístico de tipo II al carecer el estudio de la potencia suficiente. Por este motivo, para este estudio, se reunieron 1204 pacientes seleccionados mediante criterios uniformes que procedían de diferentes unidades de hipertensión repartidos por la geografía española. Según nuestros cálculos del tamaño de la muestra requerida, basados en distribución de los genotipos DD y TT entre pacientes y controles, el tamaño necesario de la muestra para observar una diferencia significativa ($p < 0,05$) en la frecuencia de estos genotipos, con riesgo relativo de 1,4 (asumiendo tamaño de

muestra desigual) es de 412 controles y 823 hipertensos para el genotipo DD y de 536 controles y 1071 hipertensos para el genotipo TT.

Por otro lado, y debido a la demostrada asociación entre los niveles plasmáticos de ECA y de AGT con los polimorfismos I/D del gen de la ECA y M235T del gen del AGT, también se investigó si la presencia simultánea de ambos marcadores en un individuo podría favorecer un aumento de la PA. Sin embargo, en nuestro estudio no se observó esta asociación ni en la población hipertensa ni en la control. Estos resultados concuerdan con los observados en los estudios más recientes (39, 40, 44, 45).

Teniendo en cuenta los criterios utilizados para la selección de la muestra y que la frecuencia de los alelos de estos dos polimorfismos en el grupo control es muy similar a la observada en otros trabajos (2, 5), estos resultados sugieren que los polimorfismos D/I del gen de la ECA y el M235T del gen del AGT no están implicados de forma importante en el desarrollo de hipertensión en la población estudiada. Sin embargo, no se puede excluir la posibilidad de que ciertas variantes alélicas del gen de la ECA y del gen del AGT estén asociados con el desarrollo de HTA ya que estos polimorfismos no son capaces de valorar toda la información contenida en el gen. Además, debido a la heterogeneidad etiológica de la HTA no podemos tampoco excluir que existan pacientes donde la influencia de estos dos genes sea fundamental para el desarrollo de hipertensión y que al mismo tiempo no lo sea para otro grupo de pacientes.

En resumen, y a pesar de las evidencias iniciales de un papel importante de los genes del SRA en el desarrollo de la HTA, esto no ha podido ser confirmado por estudios posteriores. Problemas en el diseño de los estudios, tamaño de las muestras estudiadas, definición de la enfermedad o variables que se buscan pueden imputarse en la interpretación de resultados tan dispares.

AGRADECIMIENTOS

Este trabajo ha sido financiado parcialmente mediante las siguientes becas: FIS 01/1151, FIS 00/0435, FIS 97/2123, FIS 96/0447.

APÉNDICE

Esteban Poch, Alejandro de la Sierra, Daniel González-Núñez, Josep Oriola. *Unidad de Hipertensión. Servicios de Nefrología y Medicina Interna. Hospital Clínic IDIBAPS. Barcelona.* **Josep Redón, Felipe J. Chaves, Pablo Marín, Vicente Giner.** *Unidad de Hipertensión. Servicio de Medicina Interna e Instituto de Investigaciones Citológicas. Hospital Clínico. Valencia.* **Encarnación Pamies, José Villar, Reposo Ramírez, Pablo Stiefel.** *Unidad de Hipertensión y Lípidos. Servicio de Medicina Interna. Hospital Virgen del Rocío. Sevilla.* **José Carlos Rodríguez Perez, Francisco Rodríguez Esparragón.** *Servicio de Nefrología. Hospital Dr. Negrín. Las Palmas de Gran Canaria.* **Esperanza Martínez, Lucinio Carrión, Carlos Sanchís, José Antonio Divisón.** *Grupo de Enfermedades Cardiovasculares de Albacete.*

RESUMEN

Fundamento. La hipertensión arterial (HTA) esencial tiene una base genética y el sistema renina angiotensina (SRA) desempeña un papel fundamental en la regulación de la presión arterial (PA). Polimorfismos de genes del SRA se han asociado a HTA, aunque existe discrepancia de resultados. El objetivo del trabajo es analizar la asociación entre los polimorfismos I/D de la enzima convertidora de angiotensina (ECA) y M235T de angiotensinógeno (AGT) con HTA esencial en nuestro medio.

Material y Métodos. Se estudiaron 1204 pacientes con HTA esencial (PA >140/90 mm Hg), 668 varones, de $50,8 \pm 13,6$ años de edad, PA sistólica $151,7 \pm 19,1$ y PA diastólica $94,3 \pm 13$ mm Hg (media \pm DS) y 536 mujeres de $52,4 \pm 13,9$ años de edad, PA sistólica $155,1 \pm 19,8$ PA diastólica $94,5 \pm 12,3$ mm Hg. En el grupo control se incluyeron 367 hombres y 280 mujeres sanos sin historia familiar de enfermedades cardiovasculares y con presión arterial normal. Los polimorfismos se determinaron mediante amplificación del DNA genómico con PCR, seguida de digestión con enzimas de restricción para los polimorfismos del AGT.

Resultados. La distribución de los genotipos y la frecuencia de alelos de los dos polimorfismos analizados fue similar en la población hipertensa y la control. Asimismo, no había diferencias en los niveles de presión arterial según genotipo en los pacientes hipertensos. Tampoco se observó un efecto sinérgico aditivo de los polimorfismo I/D de la ECA y M235T del AGT con el grado de PA en la población hipertensa.

Conclusión. Este estudio sugiere que la contribución del polimorfismo I/D del gen de la ECA y del polimorfismo M235T del gen del AGT al desarrollo de HTA es menos importante de lo estimado con anterioridad, al menos en la muestra estudiada.

Palabras clave: presión arterial, enzima de conversión de la angiotensina, angiotensinógeno

ABSTRACT

Background. The renin-angiotensin system (RAS) is known to regulate blood pressure. Several RAS polymorphisms have been associated to essential hypertension (EH), but there is uncertainty about this association in other studies. We examined whether the insertion/deletion (I/D) polymorphism of the angiotensin converting enzyme (ACE) gene, and the M235T polymorphism of the angiotensinogen (AGT) gene were associated with EH in a sample of hypertensive patients in Spain.

Material and Methods. We studied 1204 patients with EH (BP $>140/90$ mm Hg), 668 males, aged $50,8 \pm 13,6$ years with systolic BP $151,7 \pm 19,1$ and, diastolic BP $94,3 \pm 13$ mm Hg (mean \pm SD) and 536 female patients, aged $52,4 \pm 13,9$ years with systolic BP $155,1 \pm 19,8$ and diastolic BP $94,5 \pm 12,3$ mm Hg. As a control group, 367 men and 280 women with no family history of cardiovascular disease and with normal blood pressure were studied. The polymorphisms were determined by PCR amplification of genomic DNA, followed by enzyme digestion for the AGT gene polymorphisms.

Results. The genotype distribution and the alleles frequencies of the three RAS polymorphisms were similar in hypertensive and control subjects. Similarly, there were no differences in BP level among genotype in male or female patients. In addition, we did not find any compound effect of the I/D ACE gene and M235T AGT gene polymorphisms on BP levels in hypertensive subjects.

Conclusion. This study suggest that the contribution of the ACE I/D polymorphism and the ATG M235T polymorphism in the development of EH, seems to be less important than previously estimated, at least in the sample studied.

Key words: blood pressure, angiotensin converting enzyme, angiotensinogen

BIBLIOGRAFIA

1. Poch E, Fernandez-Llama P, Botey A. Polimorfismos del gen de la enzima de conversión de la angiotensina en la hipertensión arterial. *Hipertensión* 1997;14:297-301.
2. Rigat B, Hubert C, Alhenc-Gelas F, Cambien F, Corvol P, Soubrier F. An insertion/deletion polymorphism in the angiotensin I-converting enzyme gene accounting for half the variance of serum enzyme levels. *J Clin Invest* 1990; 86: 1343-1346.
3. Jan Danser AH, Schlekamp MADH, Bax WA, Maassen van den Brink A, Saxena PR, Riegger GA, Schurkert H. ACE in the human heart: effect of the deletion/insertion polymorphism. *Circulation* 1995; 92:1387-1388.
4. Müller DN, Bohlender J, Hilgers KF, Dragun D, Costerousse O, Ménard J, et al. Vascular angiotensin-converting enzyme expression regulates local angiotensin II. *Hypertension* 1997; 29:98-104.
5. Jeunemaitre X, Soubrier F, Kotelevtsev YV, Lifton RP, Williams CS, Charru A et al. Molecular basis of human hypertension: role of angiotensinogen. *Cell* 1992; 71: 169-180.
6. Walker WG, Whelton PK, Saito H. Relation between blood pressure and renin, renin substrate, angiotensin II, aldosterone, urinary sodium and potassium in 574 ambulatory subjects. *Hypertension* 1979; 1:287-291.
7. Kim HS, Krege JH, Kluckman KD, Hagaman JR, Hodgins JB, Best CF et al. Genetic control of blood pressure and the angiotensinogen locus. *Proc Natl Acad Sci USA* 1995; 92:2735-2739.
8. Zee RYL, Lau YK, Griffiths LR, Morris BJ. Association of a polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene with essential hypertension. *Biochem Biophys Res Commun* 1992; 184:9-15.
9. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, de la Sierra A, Revert L, et al. Polimorfismos genéticos del sistema renina-angiotensina e hipertensión arterial esencial. *Med Clin (Barc)* 1999;112:561-564.

10. Pamies E, Palmero C, García R, Stiefel P, Miranda ML, Martín V, et al. Influencia de los polimorfismos M235T del angiotensinógeno e I/D de la enzima conversiva de la angiotensina sobre la hipertensión arterial y otros factores de riesgo cardiovascular. *Med Clin (Barc)* 1999;113:164-168.
11. Martínez E, Puras A, Escribano J, Sanchís C, Carrión L, Artigao M, et al. Angiotensin-converting enzyme (ACE) gene polymorphisms, serum ACE activity and blood pressure in a Spanish-Mediterranean population. *J Hum Hypertens* 2000;14:131-135.
12. Rodríguez-Pérez JC, Rodríguez-Esparragón FJ, Hernández-Perera O, Pérez MD, Anabitarte-Prieto A, Losada-Cabrera A. Effect of the angiotensinogen gene M235T and A(-6)G variant blood pressure and other vascular risk factors in a spanish population. *J Hum Hypertens* 2000;14(12):789-793.
13. O'Donnell CJ, Lindpaintner K, Larson MG, Rao VS, Ordovas JM, Schaefer EJ, et al. Evidence for association and genetic linkage of the angiotensin-converting enzyme locus with hypertension and blood pressure in men but not women in the Framingham heart study. *Circulation* 1998; 97:1766-1772.
14. Fornage M, Amos CI, Kardia S, Sing CF, Turner ST, Boerwinkle E. Variation in the region of the angiotensin-converting enzyme gene influences interindividual differences in blood pressure levels in young white males. *Circulation* 1998; 97:1773-1779.
15. Schunkert H, Hense H, Holmer S, Stender M, Perz S, Keil U et al. Association between a deletion polymorphism of the angiotensin converting enzyme gene and left ventricular hypertrophy. *N Engl J Med.* 1994;330:1634-1638
16. Cambien F, Poirier O, Lecerf L, Evans A, Cambou JP, Arveiler D et al. Deletion Polymorphism in the gene for the angiotensin-converting enzyme is a potent risk factors for miocardial infarction. *Nature* 1992; 359: 641-644.
17. Espinosa JS, Rueda E, Muñoz E, Montiel A, Martínez S, Dieguez JL, et al. Asociación entre polimorfismo inserción/delección del gen codificador de la enzima conversora de la angiotensina e infarto de miocardio en pacientes jóvenes. *Med Clin (Barc)* 1998; 110: 488-491.

18. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Coll E, Darnell A, et al. Angiotensin converting enzyme gene polymorphism in essential hypertension and nephroangiosclerosis. *Kidney Int* 1998; 53:1743-1747.
19. Schmidt S, Van Hoof I, Grobbee D, Ganten D, Eberhard R. Polymorphism of the angiotensin I-converting enzyme gene is apparently not related to high blood pressure: Dutch Hypertension and Offspring Study. *J Hypertens*. 1993;11:345-348.
20. Lindpaintner K, Lee M, Larson MG, Rao VS. Absence of association of genetic linkage between the angiotensin-converting enzyme gene and left ventricular mass. *N Engl J Med*. 1996;334:1023-1028.
21. Staessen JA, Wang J-G, Brand E, Barlassina C, Birkenhäger WH, Herrmann S-M, Fagard R, Tizzoni L, Bianchi G. Effects of three candidate genes on prevalence and incidence of hypertension in a Caucasian population. *J Hypertens* 2001; 19:1349-1358.
22. Kunz R, Kreutz R, Beige J, Distler A, Sharma AM. Association between the angiotensinogen 235T-variant and essential hypertension in whites-A systematic review and methodological appraisal. *Hypertension* 1997, 30: 1331-1337.
23. Fernández-Llama P, Poch E, Oriola J, Botey A, Rivera F, Revert L. Angiotensinogen gene M235T and T174M polymorphisms in essential hypertension. Relation with target organ damage. *Am J Hypertens* 1998; 11:439-444.
24. Staessen JA, Kuznetsova T, Wand JG, Emelianov D, Vlietinck R, Fagard R. M235T angiotensinogen gene polymorphism and cardiovascular renal risk. *J Hypertens* 1999; 17:9-17.
25. Ward R. Familial aggregation and genetic epidemiology of blood pressure. En: Laragh JH, Brenner BM, eds. *Hypertension: Pathophysiology, Diagnosis and Management*. Raven Press Ltd, Nueva York, 1995; 67-88.
26. Puras A, Cooper RS. Marcadores genéticos de la hipertensión arterial: un largo camino ya iniciado. *Med Clin (Barc)* 1995; 104: 780-783.

27. Shanmugam V, Sell KW, Saha BK. Mistyping ACE heterozygotes. *PCR Meth Appl*. 1993;3:120-121.
28. Hunley TE, Julian BA, Phillips JA, Summar ML, Yoshida H, Horn RG, Brown NJ, Fogo A, Ichikawa I, Kon V: Angiotensin converting enzyme gene polymorphisms: Potential silent motif and impact of progression in IgA nephropathy. *Kidney Int* 49:571-577, 1996.
29. Caulfield M, Lavender P, Farrall M, Munroe P, Lawson M, Turner P, Clark AJL. Linkage of the angiotensinogen gene to essential hypertension. *N Engl J Med* 1994;330:1629-1633.
30. Maguchi M, Kohara K, Okura T, Li S, Takezaki M, Nishida W et al. Angiotensin-converting enzyme gene polymorphism in essential hypertension patients in Japanese populations. *Angiology* 1996; 47:643-648.
31. Jeunemaite X, Lifton RP, Hunt SC, Williams RR, Lalouel JM. Absence of linkage between the angiotensin converting enzyme and human essential hypertension. *Nat Genet* 1992; 1:72-75.
32. Cambien F, Alhenc-Gelas F, Herbeth B, Andre JL, Rakotovo R, Gonzales MF et al. Familial resemblance of plasma angiotensin-converting enzyme level: the Nancy study. *Am J Hum Genet* 1988; 43: 774-780.
33. Rigat B, Hubert C, Corvol P, Soubrier F. PCR detection of the insertion-deletion polymorphism of the human angiotensin converting enzyme gene (DCP 1) (dipeptidyl carboxypeptidase 1). *Nucl Acids Res* 1992; 20: 1433.
34. Yoshida H, Mitarai T, Kawamura T. Functional significance of AC I/D locus for controlling the ACE gene. *J Am Soc Nephrol*. 1997; 8: 633A.
35. Gambaro G, Anglani F, D'Angelo. Association studies of genetics polymorphisms and complex disease. *Lancet*. 2000; 355: 308-311
36. Sato N, Katsuya T, Rakugi H, Takami S, Nakata Y, Miki T et al. Associations of variants in critical core promoter element of angiotensinogen risk of essential-hypertension in Japanese. *Hypertension* 1997; 30:321-325.
37. Caulfield M, Lavender P, Newell-Price J, Farrall M, Kamdar S, Daniel H et al. Linkage of the angiotensinogen gene locus to human EH in African Caribbeans. *J Clin Invest* 1995; 96:687-692.

38. Fornage M, Turner ST, Sing CF, Boerwinkle E. Variation at the M235T locus of the angiotensinogen gene and essential hypertension: a population-based case-control study from Rochester, Minnesota. *Hum Genet* 1995;96:295-300.
39. Kiema T-R, Kauma H, Rantala AO, Lilja M, Reunanen A, Kesäniemi YA, Savolainen MJ. Variation at the angiotensin-converting enzyme gene and angiotensinogen gene loci in relation to blood pressure. *Hypertension* 1996;28:1070-1075.
40. Brand E, Chatelain N, Keavney B, Caulfield M, Citterio L, Grobbee D et al. Evaluation of the angiotensinogen locus in human essential hypertension- A European study. *Hypertension* 1998; 31:725-729.
41. Schmidt S, Sharma AM, Zilch O, Beige J, Walla-Friedel M, Ganten D et al. Association of M235T variant of the angiotensinogen gene with familial hypertension of early onset. *Nephrol Dial Transplant* 1995;10:1145-1148.
42. Rotimi C, Morison L, Cooper R, Oyejide C, Effiong E, Lapid M et al. Angiotensinogen gene in human hypertension: lack of association of 235T allele among Africans-Americans. *Hypertension* 1994; 24:591-594.
43. Katimani A, Rakugi H, Higaki J, Yi Z, Miki T, Ogihara T. Association analysis of a polymorphism of the angiotensinogen gene with essential hypertension in Japanese. *J Hum Hypertens* 1994; 8:521-524.
44. Niu T, Xu X, Rogus J, Zhou Y, Chen C, Yang J et al. Angiotensinogen gene and hypertension in chinese. *J Clin Invest* 1998; 188-194.
45. Hingorani AD, Sharma P, Jia H, Hopper R, Brown MJ. Blood pressure and the M235T polymorphism of the angiotensinogen gene. *Hypertension* 1996;28:907-911.

Tabla 1. Características clínicas principales de los pacientes hipertensos y de los controles.

Características clínicas	Hipertensos (n=1204)	Controles (n=647)
Hombres		
N (%)	668 (55,5)	367 (56,7)
Edad (años)	50,8 ± 13,6	53,0 ± 14,3*
IMC (kg/m²)	28,3 ± 3,8	26,7 ± 3,5*
PA sistólica (mmHg)	151,7 ± 19,1	122,4 ± 14,7*
PA diastólica (mmHg)	94,3 ± 13	72,9 ± 9,2*
Mujeres		
N	536 (44,5)	280 (43,3)
Edad (años)	52,4 ± 13,9	50,0 ± 16,7**
IMC (kg/m²)	29,2 ± 4,9	26,2 ± 4,8*
PA sistólica (mmHg)	155,1 ± 19,8	117,1 ± 14,6*
PA diastólica (mmHg)	94,5 ± 12,3	71,3 ± 9,1*

HTA = hipertensión arterial, PA = presión arterial, N = número de sujetos, IMC= índice de masa corporal.

*p<0,01, **p<0,05, t de Student hipertensos vs controles

Tabla 2. Distribución de genotipos de los polimorfismos I/D del gen de la ECA y M235T del gen del AGT y frecuencia (q) de alelos en pacientes hipertensos y sujetos control.

GEN	Genotipos			P	Alelos		P
ECA	II	ID	DD		I	D	
Hombres							
Hipertensos	103 (15,6)	316 (48)	240 (36,4)		522 (39,6)	796 (60,4)	
Controles	43 (11,8)	194 (53,2)	128 (35)	0,147	280 (38)	450 (62)	0,634
Mujeres							
Hipertensos	68 (12,7)	252 (47,2)	214 (40,1)		388 (35,3)	680 (63,7)	
Controles	39 (13,9)	126 (45)	115 (41,1)	0,80	204 (36,4)	356 (63,6)	0,989
AGT	MM	MT	TT	P	M	T	P
Hombres							
Hipertensos	166 (29)	277 (48,4)	129 (22,6)		609 (53,2)	535 (46,8)	
Controles	97 (27,6)	172 (49)	82 (23,4)	0,894	366 (52,1)	336 (47,9)	0,831
Mujeres							
Hipertensos	133 (29)	230 (50,2)	95 (20,8)		496 (54,2)	420 (45,8)	
Controles	75 (28,8)	131 (50,4)	54 (20,8)	0,998	281 (54)	239 (46)	0,951

Número de sujetos, entre paréntesis, porcentaje de sujetos, p = nivel de significación, χ^2 , controles vs. hipertensos.

Tabla 3. Características clínicas generales de los pacientes hipertensos según el genotipo I/D del gen de la ECA y M235T el gen del AGT.

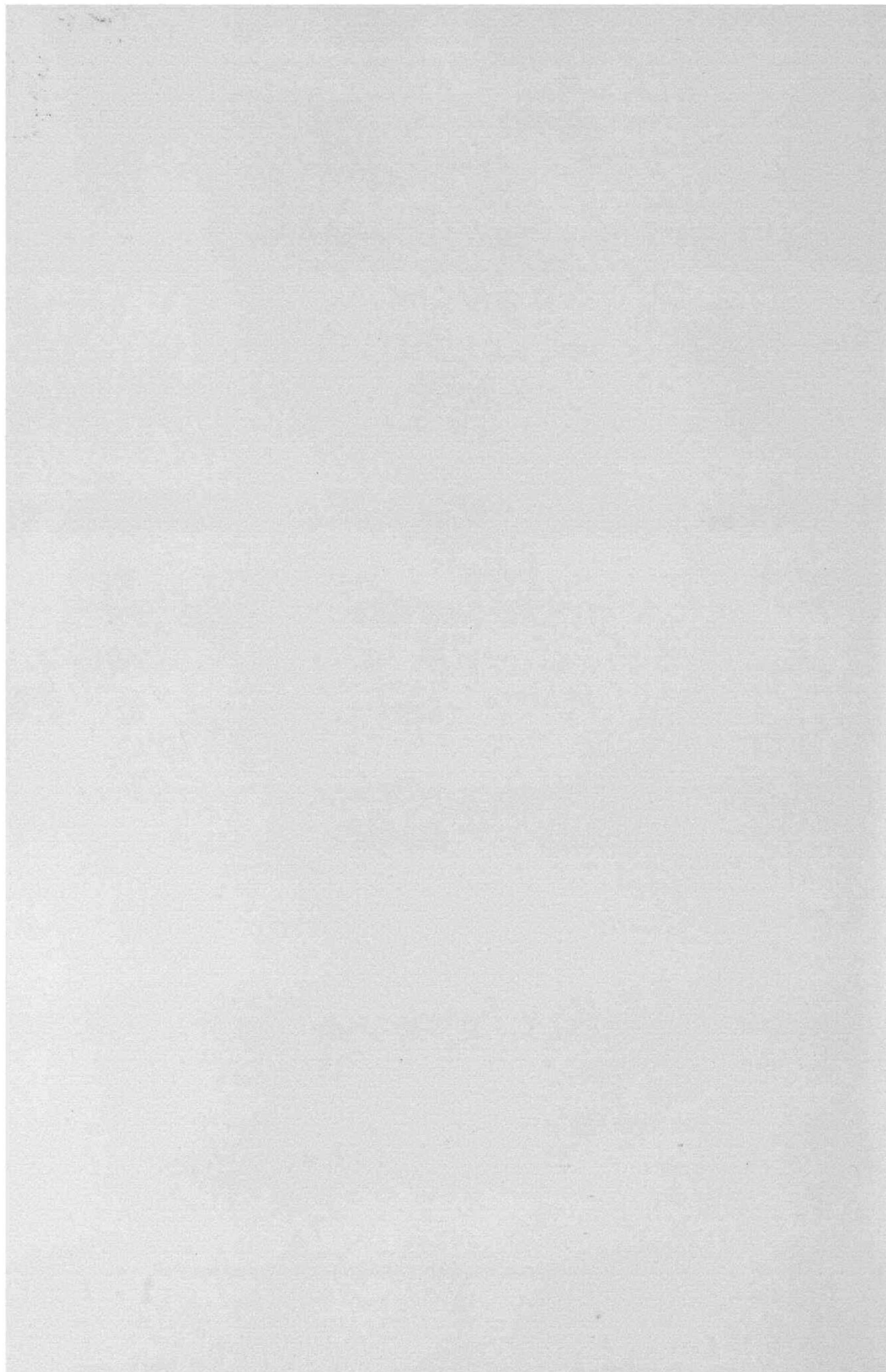
Características	Genotipo ECA			Genotipo AGT		
	II	ID	DD	MM	MT	TT
Hombres						
Edad (años)	51,8 ± 14	50,4 ± 14,1	50,6 ± 13,4	51,7 ± 14,1	52,5 ± 13,4	52,4 ± 13,6
IMC (kg/m ²)	28,1 ± 3,5	28,2 ± 4,2	28,6 ± 3,7	28,2 ± 4,5	28,5 ± 3,8	27,6 ± 3,4
PAS (mmHg)	150,4 ± 15,1	151,5 ± 19,7	149,4 ± 19,3	151,5 ± 20,9	151,2 ± 18,7	149,7 ± 19,7
PAD (mmHg)	93,6 ± 10,4	94,2 ± 13,1	93,1 ± 13,7	94,1 ± 14,1	93,9 ± 12,9	93,1 ± 13,8
Mujeres						
Edad (años)	52,4 ± 13,5	52,6 ± 14,7	51,9 ± 13,8	54,6 ± 13,4	53 ± 14,7	53,2 ± 12,7
IMC (kg/m ²)	28,9 ± 4,8	28,6 ± 4,8	29,7 ± 5,2	28,9 ± 4,9	29,3 ± 4,6	29,3 ± 4,6
PAS (mmHg)	154,1 ± 19,9	156,1 ± 21,7	153,4 ± 17,8	158,2 ± 20,7	153,4 ± 19	154,6 ± 23,7
PAD (mmHg)	94,7 ± 13,5	93,8 ± 12,5	94,4 ± 11,9	95,2 ± 11,6	94,4 ± 13,6	93,8 ± 12,7

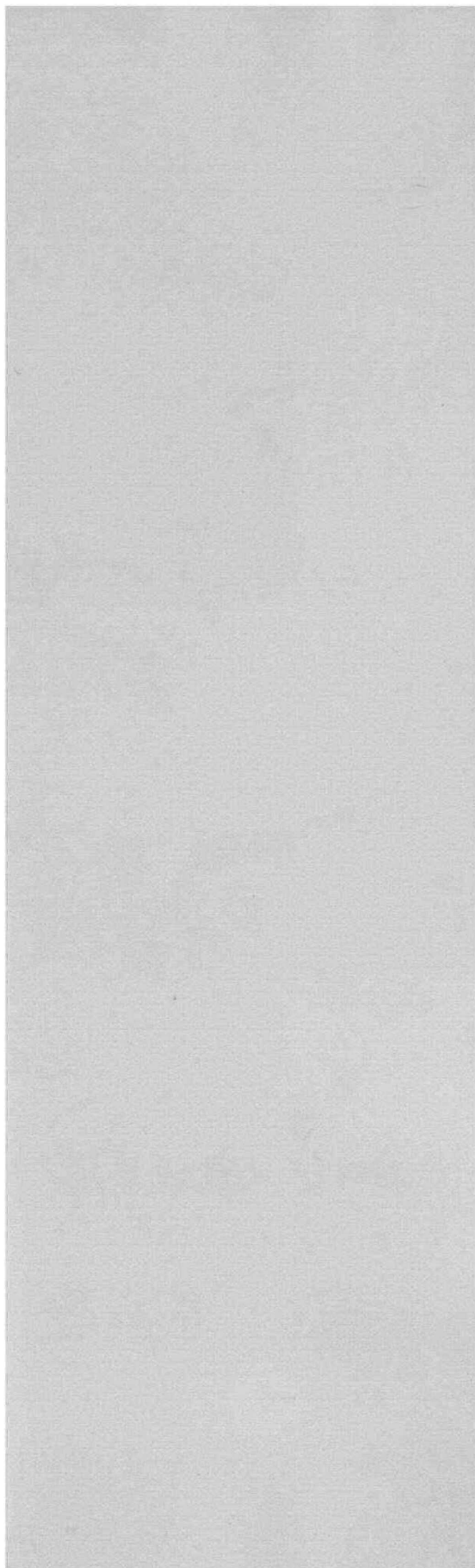
PA = presión arterial, IMC= índice de masa corporal, ANOVA

Tabla 4. Distribución del nivel de presión arterial sistólica y diastólica en función del genotipo I/D de la ECA y del genotipo M235T del AGT en los pacientes hipertensos.

	Presión arterial sistólica (mmHg)			Presión arterial diastólica (mmHg)		
	Polimorfismo I/D			Polimorfismo I/D		
	DD	DI	II	DD	DI	II
M235T						
MM	152,6 ± 20,3 (n=117)	157,3 ± 22,9 (n=130)	152,4 ± 16,6 (n=50)	95,2 ± 14,6 (n=116)	95,2 ± 12 (n=129)	92,7 ± 11,5 (n=50)
MT	152,2 ± 18,1 (n=196)	152 ± 19,9 (n=245)	152,2 ± 18 (n=65)	94,2 ± 12,6 (n=196)	94 ± 13,8 (n=245)	94,8 ± 13,2 (n=65)
TT	149,7 ± 20,5 (n=83)	153,7 ± 22,9 (n=110)	149,8 ± 19,7 (n=28)	92,1 ± 13 (n=83)	93,9 ± 13,8 (n=111)	94,8 ± 12,8 (n=28)

Análisis del efecto sinérgico de los genotipos del gen de la ECA (enzima de conversión de la angiotensina) y del del AGT (angiotensinógeno). Entre paréntesis, número de sujetos. (two-way ANOVA).





Carlos Lencina
Encuadernador
Tls. 968200077
200889
(Mercurio)